

**Vergleichende Analyse frühkindlicher und (prä-) pubertärer  
Insel-Autoimmunitätsmerkmale in der Pathogenese des  
Typ 1 Diabetes bei Kindern der BABYDIAB-Studie**

Ruth Chmiel

# **TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Institut für Diabetesforschung, Helmholtz Zentrum München  
Forscherguppe Diabetes der Technischen Universität München (TUM)

## **Vergleichende Analyse frühkindlicher und (prä-) pubertärer Insel- Autoimmunitätsmerkmale in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes bei Kindern der BABYDIAB-Studie**

Ruth Chmiel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Anette-Gabriele Ziegler
2. Priv.-Doz. Dr. Hana Algül

Die Dissertation wurde am 14.08.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.04.2014 angenommen.

Diese Arbeit ist meinen Eltern und meinen Geschwistern gewidmet.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Zielstellung</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Grundlagen</b> .....	<b>6</b>
3.1 Ätiologie und Pathogenese .....	6
3.1.1 Typ 1 Diabetes assoziierte Autoantikörper .....	9
3.2 Prädiktion des T1DM anhand von Autoantikörpern.....	14
(Bisherige Studienergebnisse und heutiger Stand der Forschung).....	14
<b>4. Materialien und Methoden</b> .....	<b>19</b>
4.1 Untersuchungsgruppen.....	19
4.2 Materialien .....	21
4.2.1 Chemikalien, Reagenzien.....	21
4.2.2 Puffer .....	21
4.2.3 Geräte und Gebrauchsgegenstände .....	21
4.2.4 Verbrauchsmaterialien, Kit .....	22
4.3 Methoden .....	23
4.3.1 Radioimmunoassays .....	23
4.3.2 Bestimmung der IAA-, GADA-, und IA-2A-Affinitäten .....	26
4.3.3 Bestimmung der Genotypen .....	26
4.4 Analyse-Plan .....	27
4.5 Statistik .....	28
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
5.1 Initiale Immunisierungsmuster in Abhängigkeit vom Alter bei Serokonversion .....	29
5.1.1 Autoantikörperanzahl und -Prävalenz.....	29
5.1.2 Autoantikörper-Titer .....	30
5.2 Antigen-spezifisches Immunisierungsmuster in Abhängigkeit vom Alter.....	31
5.2.1 Epitop-Spezifitäten beim erstmaligen Auftreten von GADA, IA-2A und ZnT8A.....	31
5.2.2 Autoantikörper-Affinitäten .....	37
5.3 Autoantikörper-Profile im Verlauf .....	39
5.3.1 Autoantikörperanzahl und -Prävalenz im Verlauf.....	39
5.3.2 Autoantikörper-Titer im Verlauf.....	41
5.4 Antigen-spezifisches Muster im Verlauf .....	42
5.4.1 Epitop-Spezifitäten von GADA, IA-2A und ZnT8A im Verlauf .....	42
5.4.2 Autoantikörper-Affinitäten im Verlauf .....	48
5.5 Genotyp und Einfluss auf den Ak-Status.....	50
5.6 Progression zu multiplen Antikörpern und zum T1DM .....	54
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>60</b>
<b>7. Zusammenfassung</b> .....	<b>74</b>

---

<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>81</b>
<b>9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>93</b>
<b>11. Vorträge, Abstract .....</b>	<b>94</b>

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AAk	Autoantikörper
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
°C	Grad Celsius
CI	Konfidenzintervall
cpm	counts per minute = Impulse pro Minute
DAISY	Diabetes Autoimmunity Study in the Young
DIPP	Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Project
DM	Diabetes mellitus
GABA	γ-Aminobuttersäure (γ-aminobutyric acid)
GAD	Glutamatdecarboxylase (glutamic acid decarboxylase)
GAD65	65kDa Isoform der Glutamatdecarboxylase
GAD67	67kDa Isoform der Glutamatdecarboxylase
GADA	Autoantikörper gegen Glutamatdecarboxylase
HLA	humanes Leukozytenantigen (human leucocyte antigen)
<sup>125</sup> I	radioaktives Jod-Isotop
IA-2(β)	Insulinoma-assoziiertes Antigen-2(β)
IA-2A	Antikörper gegen das Insulinoma-assoziiertes Antigen-2
IAA	Insulinautoantikörper
ICA	zytoplasmatische Inselzellantikörper (cytoplasmatic islet cell antigen)

---

INS	Insulinen
IQR	Interquartilbereich
kDa	Kilodalton
pH	pondus Hydrogenii (neg. dek. Logarithmus der Protonenkonzentration)
PTP	Protein Tyrosinphosphatase
rh	rekombinant human
<sup>35</sup> S	radioaktives Schwefel-Isotop
Tab.	Tabelle
T1DM	Typ-1 Diabetes mellitus
TBST	Tris-Buffered Saline Tween®20
TEDDY	The Environmental Determination of Diabetes in the Young
VNTR	variable number of tandem repeats
U	Einheit (unit)
ZnT8	Zinktransporter 8
ZnT8A	Autoantikörper gegen Zinktransporter 8

## 1. Einleitung

Der Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) ist eine chronische organspezifische Autoimmunerkrankung, die durch eine selektive Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans-Inseln im Pankreas hervorgerufen wird (Atkinson and Eisenbarth 2001). Beim T1DM führen vermutlich ein Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und noch weitgehend unbekanntem Umweltfaktoren zu humoraler und zellulärer Inselautoimmunität, assoziiert mit einer gestörten Immunregulation (Atkinson and Eisenbarth 2001). Die Prävalenz des T1DM in Deutschland beträgt gegenwärtig ca. 0,4% (Ehehalt, Blumenstock et al. 2008). T1DM kann in jedem Alter auftreten (Krolewski, Warram et al. 1987), etwa 40% entwickeln die Erkrankung jedoch bereits vor dem 20. Lebensjahr. T1DM ist die Ursache für etwa 90% aller Diabetesfälle bei Kindern und Jugendlichen und bei 5-10% aller erwachsenen Diabetespatienten (EURODIAB ACE Study Group 2000; Adeghate, Schattner et al. 2006). Somit ist der Typ 1 Diabetes die häufigste Stoffwechselerkrankung des Kindesalters (Danne, 2010).

Seit den 1950er Jahren wird in hoch entwickelten Ländern weltweit ein stetiger Anstieg der Inzidenz des T1DM, vor allem bei Kindern beobachtet (Karvonen, Viik-Kajander et al. 2000; Todd 2010). Dabei verdoppelt sich die Neuerkrankungsrate etwa alle 20-30 Jahre. Für Europa wurde die Zahl der T1DM-Neuerkrankungen bei Kindern unter 15 Jahren für das Jahr 2005 auf etwa 15 000 geschätzt. Für das Jahr 2020 werden etwa 24 400 neue Fälle prognostiziert. Eine Heilung oder Prävention der Erkrankung ist bis heute nicht möglich. Aufgrund verbesserter Therapiemöglichkeiten und intensiver Diabetes-Schulungen können heutzutage die meisten Patienten ein nahezu normales Leben führen. Dennoch kommen auch heute noch schwerwiegende Akutkomplikationen wie Ketoazidose und Hypoglykämien, mikro- und makrovaskuläre Folgeerkrankungen wie beispielsweise Erblindung, kardiovaskuläre Erkrankungen, die Diabetische Neuropathie, eine terminale Niereninsuffizienz, oder Amputationen und besonders auch psychische Probleme vor (DCCT Research Group, 1993; Kulzer, 2010; Nathan, Lachin et al. 2003). Diese verursachen eine Einschränkung der Lebensqualität bei den betroffenen Patienten, sowie immense Kosten für unser Gesundheitssystem.

Die genaue Ätiologie und Pathogenese des Typ 1 Diabetes ist bis heute nicht geklärt, jedoch von größter Bedeutung um Personen mit hohem Risiko zu erkennen und neue Präventionsansätze zu entwickeln. Erst wenn 80-90% der Betazellen zerstört sind, wird der Typ 1 Diabetes klinisch manifest (Foulis, Liddle et al. 1986), da der Blutzuckerspiegel dann aufgrund des Insulinmangels nicht mehr ausreichend reguliert werden kann. Die

prädiabetische Phase kann sich über einen individuell sehr variablen Zeitraum vollziehen (Monate bis Jahre).

Die Bestimmung von T1DM-spezifischen Autoantikörpern im Serum ist die derzeit beste Methode zum frühzeitigen Nachweis von Inselzellautoimmunität. Der Nachweis dieser metabolischen Marker ermöglicht eine indirekte Aussage über das Ausmaß der autoimmunen Zerstörung von  $\beta$ -Zellen, noch bevor metabolische Störungen im intravenösen oder oralen Glukosetoleranztest auftreten, da es bislang keine Möglichkeit zur routinemäßigen Bestimmung der  $\beta$ -Zell-Masse in vivo gibt. Durch diese Fähigkeit der Früherkennung von Inselautoimmunität anhand humoraler Marker, zu einem Zeitpunkt an dem noch eine ausreichende  $\beta$ -Zell-Masse vorhanden ist, können betroffene Personen identifiziert und in Interventionsstudien zur Prävention eines T1DM integriert werden. Autoantikörper gegen Insulin (IAA), Glutamat-Decarboxylase (GADA), das Protein Tyrosin Phosphatase homologe Inselzellantigen IA-2 (IA-2A) sowie gegen den Zink Transporter 8 (ZnT8A) sind die derzeit am besten untersuchten und für die Diabetesprädiaktion am häufigsten verwendeten Immunmarker. Das Auftreten von Autoantikörpern geht jedoch nicht in jedem Fall mit einer T1DM Entwicklung einher. Bei einigen Personen mit familiärem Diabetesrisiko beobachtet man das Auftreten einzelner Autoantikörper, die nach einiger Zeit wieder verschwinden (transiente Autoantikörper) (Yu, Yu et al. 2000) oder auch über viele Jahre hinweg persistieren, ohne dass es zur Manifestation eines T1DM kommt. Vorhergehende Studien konnten jedoch zeigen, dass das Auftreten mehrerer Autoantikörper mit einem deutlich höheren individuellen Risiko für eine Progredienz des Krankheitsprozesses assoziiert ist (Bingley, Christie et al. 1994; Kulmala, Savola et al. 1998; Gardner, Gale et al. 1999; Achenbach, Warncke et al. 2004). Das Vorhandensein multipler Autoantikörper bedeutet jedoch nicht in jedem Fall, dass es zu einer schnellen Progression der  $\beta$ -Zell-Zerstörung kommt, so dass es sinnvoll erscheint eine genauere Charakterisierung der humoralen Autoimmunantwort gegen Betazell-Antigene, sowie eine Typisierung prädisponierender Gene durchzuführen. Die Bestimmung zusätzlicher Marker wie Titer, Epitopspezifität und Affinität, sowie die Genotypisierung erlauben eine weitere Stratifizierung des Risikos eine Progression des autoimmunen Zerstörungsprozesses durchzumachen, welche schließlich in der klinischen Manifestation der Erkrankung mündet. Dies hilft besonders bei der Auswahl geeigneter Patienten für Immuninterventionsstudien aus dem Kollektiv Autoantikörper-positiver Personen. Bisher wurden in vorhergehenden Arbeiten nur selten alle Parameter untersucht. Die meisten Studien konzentrierten sich auf die Analyse einzelner Marker (Z.B. Epitop-Spezifität oder Autoantikörper-Affinität). Bei solch einer ausschließlichen Betrachtung einzelner Charakteristika ist es jedoch nicht möglich das

komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Marker und eventuelle pathogenetische Zusammenhänge erkennen.

Wie bereits oben erwähnt, kann sich die präklinische Phase des Autoimmunprozesses über einen individuell sehr variablen Zeitraum vollziehen. Bei Kleinkindern werden oft schnell-progressive Verläufe beobachtet, dagegen zeigen Erwachsene oder ältere Kinder häufig eine langsamere Progression, oder entwickeln überhaupt keinen Diabetes. Die unterschiedlichen Verlaufsformen sprechen für eine sehr heterogene, individuell unterschiedliche Pathogenese des T1DM, welche durch multiple genetische und exogene Faktoren beeinflusst wird (Achenbach, Bonifacio et al. 2005). Diese Faktoren können sowohl zur Entstehung und Progression der Erkrankung beitragen, als auch protektiv wirken.

Vor allem die Entstehung und Progression von Inselautoimmunität bei Kindern wurde durch prospektive Studien wie BABYDIAB (in Deutschland seit 1989) (Ziegler, Hummel et al. 1999), DAISY und DIPP (in den USA und Finnland) (Rewers, Norris et al. 1996; Kukko, Virtanen et al. 2004) vom Zeitpunkt der Geburt an detailliert untersucht. Aus bisherigen Untersuchungen bei Kindern aus Familien mit mindestens einem erstgradig Verwandten mit T1DM, die im Rahmen der BABYDIAB-Studie beobachtet wurden, geht hervor, dass das Neuauftreten von Autoantikörpern gegen Beta-Zell-Antigene bereits in den ersten beiden Lebensjahren deutlich ansteigt, im Alter von etwa 2 Jahren (frühkindliche Inselautoimmunität) einen ersten Gipfelpunkt erreicht und danach wieder absinkt (Ziegler, Hummel et al. 1999; Hummel, Bonifacio et al. 2004). Ein zweiter Anstieg der Inzidenz ist ab dem Alter von etwa 8 Jahren mit Beginn der Pubertät zu beobachten (prä-/pubertäre Inselautoimmunität). Vorläufige Daten zeigen weiterhin, dass beide „Inselautoimmunitäts-Wellen“ offensichtlich mit verschiedenen charakteristischen Merkmalen assoziiert sind. So unterscheiden sich z.B. der HLA-Genotyp, die Antigen-spezifität und Affinität der Autoantikörper sowie die Geschwindigkeit der Ausweitung der Autoimmunreaktion von singulären zu multiplen Ziel-Antigenen. Da eine detaillierte Analyse der unterschiedlichen Immunreaktionen bisher noch aussteht und die prognostische Relevanz des Neuauftretens von Autoantikörpern im Pubertätsalter zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht endgültig beurteilt werden kann, ist diese Analyse Teil der vorliegenden Arbeit.

In dieser Arbeit erfolgt erstmalig eine detaillierte Charakterisierung der humoralen Immunantwort in verschiedenen Stadien der Pathogenese in den zwei verschiedenen Altersgruppen (**Gruppe 1: EARLY** (= erstmaliges Auftreten von Inselautoimmunität vor dem 4. Lebensjahr) und **Gruppe 2: LATE** (= erstmaliges Auftreten von Inselautoimmunität im Alter von 4 Jahren oder später)).

Hierzu werden die Verlaufsserien von 62 Autoantikörper-positiven Kindern der Early Gruppe (medianes Alter beim erstmaligen Auftreten von Autoimmunität: 1,9 Jahre) sowie von 80 Autoantikörper-positiven Kindern der Late Gruppe (medianes Alter beim erstmaligen Auftreten von Autoimmunität: 8,0 Jahre) aus der BABYDIAB Studie auf Autoantikörper gegen Insulin (IAA), GAD 65 (GADA), IA-2 (IA-2A) und ZnT8 (ZnT8A) untersucht und hinsichtlich des Autoantikörper-Status, der Autoantikörper-Titer, der Autoantikörper-Epitop-Spezifität, der Autoantikörper-Affinität sowie hinsichtlich des Auftretens von T1DM-relevanten Genotypen charakterisiert. Alle Charakteristika werden bei Serokonversion bzw. beim erstmaligen Auftreten von Antigen-spezifischer Autoimmunität sowie im kurzfristigen Verlauf von ein bis zwei Jahren analysiert und in univariaten Analysen zwischen den beiden Gruppen verglichen. Anschließend erfolgt eine Analyse hinsichtlich der Progression zu multiplen Autoantikörpern sowie zum T1DM in den beiden Gruppen.

Durch den Vergleich der humoralen Charakteristika zwischen den beiden Gruppen sollen spezifische Immunprofile identifiziert werden, die eine bessere Diskriminierung und Phänotypisierung diabetischer Subtypen erlauben und dazu beitragen, individualisierte Therapien zu entwickeln.

## 2. Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine vergleichende Analyse von Autoantikörper-Profilen bei Kleinkindern und bei älteren Kindern/Jugendlichen von Eltern mit T1DM zum Zeitpunkt der Serokonversion bzw. zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von Inselantigen-spezifischer Autoimmunität sowie nach ein bis zwei Jahren Verlauf. Dem vorliegenden Dissertationsprojekt liegt die Hypothese zugrunde, dass sich die bisher beobachteten Unterschiede in der frühkindlichen (**EARLY**= erstmaliges Auftreten von Inselautoimmunität vor dem 4. Lebensjahr) und (prä)pubertären (**LATE**= erstmaliges Auftreten von Inselautoimmunität mit 4 Jahren oder später) Inselautoimmunität auf verschiedene Immunisierungsmuster zurückführen und anhand der erkannten molekularen Ziele/Epitope und weiterer Merkmale differenzieren lassen, und damit zur besseren Prädiktion der Erkrankung beitragen können.

Spezifische Fragestellungen:

### 1) *Definition von Immunisierungsmustern in den zwei untersuchten Gruppen*

Welche und wie viele Beta-Zell-Antigene sind zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von Inselautoantikörpern Ziele der Immunreaktion? Welche Regionen dieser Antigene beherbergen initiale (immunisierende) Epitope? Wie sind die Autoantikörper-Affinität und der Autoantikörper-Titer? Welche Immunisierungsmuster treten häufig bzw. selten auf und bei wem?

### 2) *Definition von Progressionsmustern in den zwei untersuchten Gruppen*

Wie verändern sich Autoantikörperprofile im kurzfristigen Verlauf von ein bis zwei Jahren? Welche Immunisierungsmuster sind mit Progression verbunden? Welche Muster gehen eher mit chronischem Verlauf einher?

### 3) *Assoziation von Progressionsmustern zur Ätiologie des T1D*

Besteht eine Beziehung zwischen dem Auftreten von Progression zu multiplen Autoantikörpern und dem Vorliegen bestimmter Genotypen?

4) Unterscheiden sich zwischen den beiden Gruppen diejenigen Kinder voneinander, die eine Progression zu multiplen Autoantikörpern und schließlich zum T1DM durchmachen bezüglich der Schnelligkeit der Progression?

### 3. Grundlagen

#### 3.1 Ätiologie und Pathogenese

Der T1DM ist eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung. Man vermutet, dass sowohl das Auftreten als auch die Progression von Inselautoimmunität durch das Zusammenwirken von prädisponierenden Genen, einer gestörten Immunregulation und exogenen Faktoren (Umweltfaktoren) beeinflusst wird.

Prädisponierende Gene sind ein wesentlicher Pfeiler der Pathogenese des T1DM.

Eine Einschätzung des Risikos einen Typ 1 Diabetes zu entwickeln, kann anhand des Vorkommens bestimmter *genetischer* Muster und der familiären Vorbelastung erfolgen.

So haben Verwandte ersten Grades von Erkrankten gegenüber der Normalbevölkerung ein 10fach erhöhtes Risiko an Diabetes zu erkranken (Eisenbarth et al., 1992). Auch die Anzahl der erkrankten Familienmitglieder stellt einen wichtigen Risikofaktor dar.

Analysen der BABYDIAB Kohorte zeigen, dass das Risiko einen T1DM zu entwickeln sich merklich erhöhte wenn beide Eltern oder ein Elternteil und ein Geschwister T1DM hatten, als wenn nur ein erstgradig Verwandter betroffen war (3-8% vs. 25%) (Bonifacio, Hummel et al. 2004). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass nur etwa 10-13% der Kinder mit neu manifestiertem Typ 1 Diabetes einen erkrankten erstgradigen Verwandten haben. Dagegen zeigen 87-90% keine familiäre Vorbelastung (Dahlquist, Blom et al. 1985; Redondo and Eisenbarth 2002). Eine weitere Möglichkeit zur Einschätzung des Diabetesrisikos vor der Entwicklung von Autoantikörpern gegen Inselzellantigene, ist die Untersuchung des Genotyps. Assoziationen zum T1DM wurden bisher für mehr als 40 verschiedene Gen-Loci beschrieben (Barrett, Clayton et al. 2009; Pociot, Akolkar et al. 2010). Den bedeutendsten Einfluss auf die Diabetesentstehung haben Gene der *HLA (human leucocyte antigen) Klasse II* Region des MHC (major histocompatibility complex) auf Chromosom 6p21 (IDMM1) (Buzzetti, Quattrocchi et al. 1998). In bis zu 50% der Fälle kann das familiär gehäufte Auftreten von T1DM durch das Vorhandensein bestimmter HLA-Allele erklärt werden. Während einige HLA-Allele mit erhöhtem Risiko für Erkrankung einhergehen (z.B. HLA DRB1\*0301) gibt es auch welche, die Protektion vor der Erkrankung vermitteln (z.B. HLA DQB1\*0602) (Pugliese, Gianani et al. 1995; Kulmala, Savola et al. 2000; Eisenbarth 2007). Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Genotypen HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 und HLA DR4-DQ-8/DR4-DQ8 mit dem höchsten Diabetesrisiko assoziiert sind (Gillespie, Gale et al. 2002; Redondo and Eisenbarth 2002; Walter, Albert et al. 2003).

Je nach Nationalität sind etwa 15-35% der Patienten mit T1DM HLA-DR3-DQ2/DR4-DQ8 heterozygot (verglichen mit etwa 1-3% in der Allgemeinbevölkerung) und bei etwa der Hälfte der Kinder, die T1DM bereits vor dem 5. Lebensjahr entwickeln, liegt dieser Hochrisikogenotyp vor (Achenbach et al., 2008a; Gillespie, Gale et al. 2002). Im Gegensatz dazu weisen etwa 20% der Bevölkerung, jedoch nur weniger als 1% der Kinder mit Typ 1 Diabetes den protektiven HLA-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602- Haplotyp auf (Achenbach et al., 2008a).

Ein zweiter diabetesassoziierter Genort (*IDDM2*) wurde auf dem Chromosom 11p15 in der *Promoterregion des Insulingens (INS VNTR)* beschrieben (Bennett, Lucassen et al. 1995). Im Vergleich zum HLA-Genotyp hat der INS VNTR (variable number of tandem repeats) Polymorphismus einen geringeren Einfluss auf die T1DM Entstehung (Gianani and Eisenbarth 2005; Gillespie 2006). Bisherige Studien zeigen, dass Patienten oder Verwandte von Typ 1 Diabetikern mit den protektiven INS VNTR Klasse I/III oder III/III Genotypen relative Protektion für das Auftreten von IAA aufweisen. Dagegen ist mit dem INS VNTR Klasse I/I Genotyp ein gehäuftes Auftreten der Autoantikörper gegen Insulin assoziiert (Graham, Hagopian et al. 2002; Walter, Albert et al. 2003). Das erhöhte Risiko des INS VNTR Genotyps kann durch eine verminderte Expression von (Pro-) Insulin im Thymus und eine dadurch bedingte Störung der Ausprägung einer zentralen Immuntoleranz gegenüber dem Insulinmolekül erklärt werden (Vafiadis, Bennett et al. 1997).

Weitere Gene die eine Assoziation mit T1DM zeigen sind unter anderem CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozytenantigen), PTPN22 (Protein-Tyrosinphosphatase N22), IFIH1 (Interferon induzierte Helikase 1) und IL2RA (Interleukin-2 Rezeptor alpha) (Todd, Walker et al. 2007). Polymorphismen in diesen und anderen Genen prägen den individuellen Phänotyp der Inselautoimmunität und kennzeichnen den T1DM als eine polygene Erkrankung.

Da, wie bereits oben erwähnt, nur etwa 10% der Neumanifestationen eine familiäre Vorbelastung aufweisen, würde ein generelles Screening der HLA Klasse II- und INS VNTR-Genotypen in der Allgemeinbevölkerung nur einen kleinen Teil der später erkrankten Kinder erfassen und wäre zu kostenintensiv. Daher wird ein genetisches Screening heutzutage vor allem im Rahmen von wissenschaftlichen Studien zur Primärprävention des Auftretens von Autoantikörpern bei Kleinkindern mit hohem Diabetesrisiko durchgeführt.

Neben genetischen Faktoren spielen höchstwahrscheinlich auch Umwelteinflüsse eine Rolle in der Entstehung des T1DM. Dies wird vor allem dadurch deutlich, dass die Konkordanz für T1DM bei eineiigen Zwillingen „nur“ 40-50% beträgt (Kyvik, Green et al. 1995; Hyttinen, Kaprio et al. 2003; Redondo, Jeffrey et al. 2008). Umweltfaktoren die als Auslöser für Betazellautoimmunität vermutet werden beinhalten Nahrungsfaktoren, virale Infektionen, Impfungen und Andere. Für die folgenden Viruserkrankungen ist ein Zusammenhang der Entstehung des Typ 1 Diabetes beschrieben worden: Kongenitale Röteln, Rotavirusinfektionen und Enterovirusinfektionen (Menser, Forrest et al. 1978; Honeyman, Coulson et al. 2000; Lonrot, Korpela et al. 2000). Ernährungsfaktoren, für die eine Assoziation mit T1DM beschrieben wurden, sind: Stilldauer, frühe Exposition gegenüber Kuhmilch oder glutenhaltiger Nahrung und ein Vitamin D-Mangel (Vaarala, Knip et al. 1999; Hypponen, Laara et al. 2001; Akerblom, Vaarala et al. 2002; Fuchtenbusch, Ziegler et al. 2004; Sadauskaite-Kuehne, Ludvigsson et al. 2004). Einige Studien zeigen, dass eine frühe Aufnahme von Getreide oder Gluten bei Säuglingen mit einem HLA-Hochrisikotyp das Risiko für Inselautoimmunität erhöht (Norris, Barriga et al. 2003; Ziegler, Schmid et al. 2003). Bis heute wurde jedoch kein einzelner exogener Faktor identifiziert, welcher zu einer Induktion der Betazellzerstörung führt, und einige der bisher verfügbaren Daten sind widersprüchlich. In diesem Zusammenhang hat sich die internationale TEDDY-Studie (*The Environmental Determinants of Diabetes in the Young*) zum Ziel gesetzt, bei genetisch prädisponierten Kindern in den USA, Deutschland, Schweden und Finnland von Geburt an über einen Zeitraum von 15 Jahren zu untersuchen, welche Umwelteinflüsse mit der Entstehung des T1DM assoziiert sein können (Group 2008).

Pathologisch-anatomisch liegt dem T1DM eine selektive Zerstörung der Betazellen der Langerhans-Inseln im Pankreas zugrunde. Dem Ausbruch der Erkrankung geht eine Phase der prädiabetischen Inselentzündung (Insulitis) voraus. Die Inseln werden dabei mit einer heterogenen Population aus T-Lymphozyten (CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen), B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen infiltriert (Hanninen, Jalkanen et al. 1992; Itoh, Hanafusa et al. 1993). Erst wenn 80-90% der Betazellen zerstört sind, wird der Typ 1 Diabetes klinisch manifest, da die Glukosehomöostase durch geringe Mengen Insulin aufrechterhalten werden kann. Von Beginn der  $\beta$ -Zellzerstörung bis zum Ausbruch der Erkrankung können mehrere Monate oder auch Jahre vergehen (Foulis, Liddle et al. 1986). Der früheste diagnostische Marker für das Bestehen von Inselautoimmunität ist das Auftreten von Autoantikörpern gegen Betazellantigene im peripheren Venen- und Kapillarblut (Bingley, Christie et al. 1994).

Gegen Inselantigene gerichtete T-Zellen sind auch von Beginn an in den Autoimmunprozess involviert, besitzen jedoch gegenwärtig keine große diagnostische Bedeutung, da sie im peripheren Blut nur mit großer Schwierigkeit zu detektieren sind (Atkinson, Honeyman et al. 2000).

Metabolische Störungen im intravenösen oder oralen Glukosetoleranztest weisen auf ein bereits fortgeschrittenes Stadium der Betazellzerstörung hin, und sind in der frühen Phase des Autoimmunprozesses noch nicht pathologisch verändert. Obwohl nach gegenwärtigem Wissensstand nicht davon auszugehen ist, dass Autoantikörper direkt an der Zerstörung der Betazellen beteiligt sind, besitzt die Messung von Autoantikörpern derzeit den besten prädiktiven Aussagewert, um ein erhöhtes Diabetesrisiko zu erfassen oder auszuschließen bzw. um die Intensität der Inselautoimmunität und das damit verbundene Voranschreiten der Zerstörung von Betazellen einzuschätzen.

### **3.1.1 Typ 1 Diabetes assoziierte Autoantikörper**

Inselautoantikörper treten schon im Kindesalter auf und sind bereits Jahre vor der Manifestation des T1DM nachweisbar (Bingley, Christie et al. 1994; Ziegler, Hummel et al. 1999; Kimpimaki, Kulmala et al. 2002). Die derzeit bedeutendsten Marker für Diagnostik und Prädiktion des T1DM sind Autoantikörper gegen Insulin (IAA) (Palmer, Asplin et al. 1983), Glutamatdecarboxylase (GAD) (Baekkeskov, Aanstoot et al. 1990), die Protein Tyrosin Phosphatase (PTP)-homologen Proteine IA-2 (ICA 512) und IA-2 $\beta$  (Phogrin) (Lan, Lu et al. 1994; Rabin, Pleasic et al. 1994; Lu, Li et al. 1996; Wasmeier and Hutton 1996) sowie gegen den Zink-Transporter 8 (ZnT8) (Wenzlau, Juhl et al. 2007).

Diese dominanten T1DM Autoantikörper sind fast alle mit dem Sekretionsapparat der Betazelle assoziiert, was vermuten lässt, dass Autoimmunität gegen diese Komponenten der Betazellen eine hohe pathogenetische Relevanz besitzt.

Die Messung von Autoantikörpern gegen diese vier Hauptzielantigene ist eine wesentliche Grundlage zur Einschätzung eines T1DM Risikos bei Kindern (Kulmala, Savola et al. 1998; Bingley, Bonifacio et al. 2001; LaGasse, Brantley et al. 2002). Die Bestimmung der zytoplasmatischen Inselzellantikörper (ICA) hat heutzutage nur noch eine geringe diagnostische Bedeutung, da ihr Nachweis technisch sehr aufwendig und nur schwierig standardisierbar, und die kombinierte Testung der oben genannten Autoantikörper verfügbar ist (Achenbach et al., 2008a; Bingley 2010).

Eine Vielzahl weiterer Zielantigene von Autoantikörpern und zum Teil auch von autoreaktiven T-Zellen wurden in verschiedenen Arbeiten mit dem T1DM assoziiert, ihre Relevanz für die Erkrankung ist jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch ungewiss (Lieberman and DiLorenzo 2003; Bottini, Musumeci et al. 2004).

#### Autoantikörper gegen Insulin (IAA)

Bereits 1983 wurden Autoantikörper gegen körpereigenes Insulin im Serum von noch nicht mit Insulin behandelten, neu diagnostizierten Personen mit T1DM entdeckt (Palmer, Asplin et al. 1983). Insulin ist ein Betazell-spezifisches Antigen. Die von Insulinantikörpern erkannten Epitope werden auf der A-Kette (Aminosäure 8-13) und auf der B-Kette (Aminosäure 1-3) des Moleküls vermutet (Castano, Ziegler et al. 1993). Vor allem in der Diagnostik und Prädiktion des T1DM bei Kindern spielen IAA eine wichtige Rolle. Bisherige Auswertungen konnten zeigen, dass besonders bei Kleinkindern die initiale Autoimmunreaktion häufig gegen Insulin gerichtet ist, und dass diese Antikörper somit wichtig für die Früherkennung eines T1DM sind. (Vardi, Ziegler et al. 1988; Ziegler, Hummel et al. 1999; Hummel, Bonifacio et al. 2004).

So beträgt die Prävalenz von Insulin-Autoantikörpern 50-70% bei neu entdeckten, noch nicht mit Insulin behandelten Typ 1 Diabetikern (Vardi, Ziegler et al. 1988; Vahasalo, Knip et al. 1996), bei Patienten mit einem Manifestationsalter unter 5 Jahren annähernd 100%. 3% der Allgemeinbevölkerung weisen IAA auf (Strebelow, Schlosser et al. 1999), sowie 2,5-6,7% der erstgradig Verwandten von Patienten mit Typ 1 Diabetes (Krischer, Cuthbertson et al. 2003).

#### Autoantikörper gegen Glutaminsäuredecarboxylase (GADA)

GAD ist ebenfalls eines der wichtigsten Autoantigene des T1DM (Baekkeskov, Aanstoot et al. 1990; Ludvigsson, Faresjo et al. 2008). Das Enzym katalysiert die Bildung von Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) aus Glutamat, und kommt neben dem Nervensystem auch in Betazellen des Pankreas vor (Baekkeskov, Aanstoot et al. 1990). GABA ist einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im Gehirn; im Pankreas ist seine Rolle bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt (Wang, Kerckhofs et al. 2006). Es existieren zwei Isoformen von GAD (Kaufman, Erlander et al. 1992): GAD 65 mit einem Molekulargewicht von 65 kDa und einer Länge von 585 Aminosäuren und GAD 67 mit einem Molekulargewicht von 67 kDa und einer Länge von 593 Aminosäuren, deren Aminosäuresequenz zu 70% identisch ist.

Etwa 70-80% der T1DM Patienten weisen zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation GADA auf, außerdem werden sie bei bis zu 90% der Personen in der prädiabetischen Phase detektiert, und 3% der Allgemeinbevölkerung sowie 6-13% der erstgradig Verwandten von Typ 1 Diabetikern weisen Antikörper gegen GAD auf (Bonifacio, Genovese et al. 1995; Hagopian, Sanjeevi et al. 1995; Seissler, Morgenthaler et al. 1996; Bingley, Bonifacio et al. 1997). Charakteristisch für den T1DM sind Autoantikörper gegen GAD 65. Dagegen werden Autoantikörper gegen GAD 67 nur bei einer Minderheit der T1DM Patienten gefunden (Hagopian, Michelsen et al. 1993; Seissler, Amann et al. 1993). GADA treten neben dem T1DM auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie dem Stiffman-Syndrom und dem Polyendokrinen Syndrom auf (Solimena, Folli et al. 1990; Soderbergh, Myhre et al. 2004). Bei diesen Erkrankungen werden häufig beide Isoformen (GAD 65 und 67) als Antigene erkannt (Butler, Solimena et al. 1993; Seissler, Bieg et al. 1994). Desweiteren ist GADA-Positivität kennzeichnend für eine Sonderform des Typ 1 Diabetes, den LADA (latent autoimmune diabetes in adults), einer Spätmanifestation des autoimmunen DM bei Erwachsenen (Lohmann, Kellner et al. 2001).

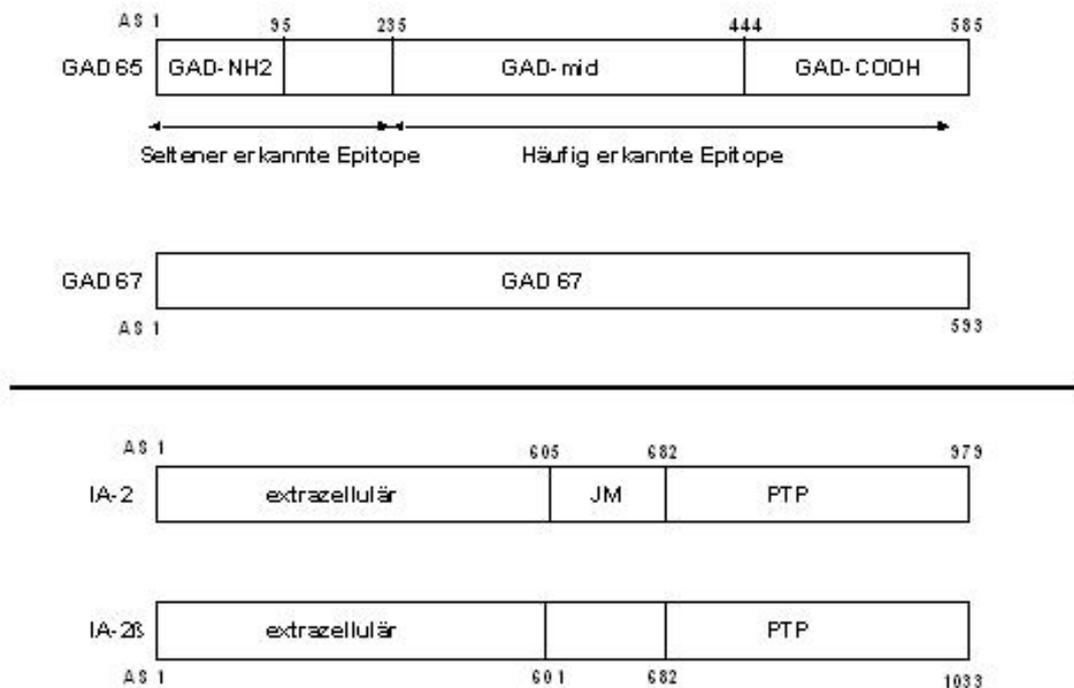
Erste Auswertungen der BABYDIAB Studie zeigen, dass Autoantikörper gegen GAD bei jüngeren Kindern oft zusammen mit oder nach IAA auftreten. Dagegen wurde das alleinige Auftreten von GADA vor allem bei älteren Kindern nachgewiesen (Ziegler, Hummel et al. 1999; Hummel, Bonifacio et al. 2004).

Folgende Epitope wurden als primäre Ziele der GADA-Reaktivität beim T1DM identifiziert: Die mittlere Region (AS 235-449) und die COOH-terminale Region (AS 450-585) von GAD 65 (Hampe, Hammerle et al. 2000; Ronkainen, Hoppu et al. 2006). In bisherigen Auswertungen der BABYDIAB Studie wurde die n-terminale Region (AS 1-100) eher zu einem späteren Zeitpunkt der prädiabetischen Phase als Antigen erkannt (Bonifacio, Lampasona et al. 2000). Im Vergleich mit anderen Autoantikörpern des T1DM sind GAD-Antikörper sehr sensitive, aber weniger spezifische Marker zur Prädiktion des T1DM.

#### Autoantikörper gegen IA-2 und IA-2 $\beta$ (IA-2A)

IA-2 (ICA 512) und IA-2 $\beta$  (Phogrin) gehören zur Familie der Protein-Tyrosinphosphatasen (PTP) und weisen beide eine PTPase ähnliche, enzymatisch inaktive Domäne auf. IA-2 und IA-2 $\beta$  kommen in den Langerhans Inseln des Pankreas und im zentralen Nervensystem vor (Lu, Li et al. 1996; Leslie, Atkinson et al. 1999).

Im Pankreas werden sie als transmembranäre Proteine von Insulin-sekretorischen Vesikeln exprimiert (Lan, Lu et al. 1994; Lan, Wasserfall et al. 1996; Lu, Li et al. 1996; Wasmeier and Hutton 1996). IA-2 und IA-2 $\beta$  bestehen aus drei Regionen: dem extrazellulären (luminalen) Bereich (AS 1-576), dem transmembranären (AS 577-600) und dem intrazellulären (zytoplasmatischen) (AS 601-979) Bereich, wobei Typ 1 Diabetes assoziierte Autoantikörper bei beiden Molekülen nur gegen die zytoplasmatische Region gerichtet sind (Lampasona, Bearzatto et al. 1996). Der zytoplasmatische Bereich beginnt mit einer juxtamembranären Region (AS 601-682), an die sich die PTP Region anschließt (AS 683-979 für IA-2 und AS 683-1033 für IA-2 $\beta$ ). Die zwei Zielantigene weisen eine 80%ige Sequenzhomologie in ihren PTP-Domänen auf. Die Homologie der AS-Sequenz beträgt weniger als 50% im juxtamembranären Anteil und 10% im extrazellulären Bereich. Etwa 70-80% der neu manifestierten Patienten weisen IA-2A auf, IA-2 $\beta$ A kommen nur bei 40% der Personen mit T1DM vor. 2% der Allgemeinbevölkerung und 2-4% der erstgradig Verwandten von Typ 1 Diabetikern weisen IA-2 Antikörper auf (Seissler, Morgenthaler et al. 1996; Strebelow, Schlosser et al. 1999; Krischer, Cuthbertson et al. 2003). Autoantikörper gegen IA-2 erkennen sowohl die juxtamembranäre Region (JM) als auch die PTP Region von IA-2 als Epitope. Autoantikörper die IA-2 $\beta$  erkennen, sind meist gegen gemeinsame Domänen der PTP Region von IA-2 und IA-2 $\beta$  gerichtet (kreuzreaktive Antikörper). Nur selten findet man IA-2 $\beta$  spezifische Autoantikörper, und diese sind immer nur gegen die PTP Region gerichtet. Autoantikörper gegen die JM Region von IA-2 $\beta$  wurden bisher nicht nachgewiesen (Bonifacio, Lampasona et al. 1998). IA-2 Autoantikörper sind spezifischer für T1DM als GADA, da sie nicht so häufig bei anderen Autoimmunerkrankungen gefunden werden (Morgenthaler, Seissler et al. 1997). IA-2A treten im Vergleich zu IAA und GADA meist zu einem späteren Zeitpunkt in der prädiabetischen Phase auf (Hawa, Rowe et al. 1997).



**Abbildung 1** Schematische Darstellung der Epitop-Spezifitäten innerhalb der Moleküle GAD 65/67 IA-2/IA-2β (Modifiziert nach Warncke K., 2004)

### Autoantikörper gegen den Zink-Transporter 8 (ZnT8A)

Ein weiteres erst kürzlich entdecktes Zielantigen für Autoantikörper bei Typ 1 Diabetikern ist der Kationentransporter ZnT8 (Wenzlau, Juhl et al. 2007). Autoantikörper gegen ZnT8 (ZnT8A) sind bei etwa 70% der Patienten zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation im Serum nachweisbar. Sie stellen, in Ergänzung zu IAA, GADA und IA-2A, einen neuen Marker zur Differentialdiagnose und Klassifizierung des T1DM dar (Wenzlau, Juhl et al. 2007). Wie IA-2A und IA-2βA richten sich ZnT8A gegen die cytoplasmatische COOH-terminale Region eines Transmembranproteins der insulinsekretorischen Vesikel.

Das für ZnT8 kodierende Gen SLC30A8 weist einen Polymorphismus auf, dessen verschiedene Varianten für Arginin, Tryptophan oder Glutamin an Aminosäureposition (aa) 325 kodieren, und dadurch ein wichtiges Epitop für ZnT8A modifizieren (Wenzlau, Liu et al. 2008). Etwa zwei Drittel der ZnT8A-positiven Patienten mit neu manifestiertem T1DM weisen Autoantikörper gegen die beiden Hauptvarianten des ZnT8-Moleküls auf, aa325-Arginin (R325) und aa325-Tryptophan (W325). Ein kombiniertes Antikörperscreening gegen diese beiden Varianten ist erforderlich, um ZnT8A positive Personen zu identifizieren.

### **3.2 Prädiktion des T1DM anhand von Autoantikörpern (Bisherige Studienergebnisse und heutiger Stand der Forschung)**

Zur Einschätzung des Typ 1 Diabetes Risikos ist vor allem der Nachweis von Autoantikörpern gegen Betazellantigene von großer Bedeutung. Bei bestätigt Autoantikörperpositiven Personen können anhand einer genauen Charakterisierung der Autoantikörperantwort Autoantikörperprofile identifiziert werden, die das 5-Jahres-Diabetesrisiko von weniger als 10% bis über 90% stratifizieren (Achenbach, Warncke et al. 2004).

Dabei werden unter anderem folgende Charakteristika unterschieden: Alter beim Auftreten von Inselautoimmunität, Anzahl der Autoantikörper, Antigenspezifität, Epitopspezifität, Antikörperaffinität und Antikörpertiter.

Dies ist vor allem für die Auswahl von Teilnehmern an Präventionsstudien hinsichtlich des Nutzen-Risiko-Verhältnisses der jeweiligen Interventionsform von Bedeutung.

#### Alter beim Auftreten von Inselautoimmunität

Das Alter beim erstmaligen Auftreten von Autoantikörpern erlaubt eine entscheidende Aussage über das Diabetesrisiko sowie die Dauer bis zur T1DM-Manifestation. Da das Alter bei Serokonversion und die damit verbundenen Charakteristika eine zentrale Rolle in der vorliegenden Arbeit spielen, soll hier ein Überblick über den bisherigen Stand der Forschung gegeben werden.

Bisher gibt es einige Arbeiten, die sich mit Autoantikörpercharakteristika bei Kleinkindern befasst haben (Rewers, Norris et al. 1996; Ziegler, Hummel et al. 1999; Kimpimaki, Kupila et al. 2001). Zu Autoimmunitätsmustern bei älteren Kindern sind jedoch bisher nur sehr wenige Daten vorhanden. Die finnische Gruppe um Knip sowie eine belgische Studie mit Verwandten von Typ 1 Diabetikern konnten zeigen, dass Inselautoimmunität in jedem Alter auftreten kann. Diese Arbeiten zeigten jedoch auch, dass bei Antikörperpositiven Kleinkindern die Progressionsrate zum Diabetes höher ist als bei älteren Verwandten, und dass transiente Autoantikörper zwar in allen Altersgruppen vorkommen, jedoch bei älteren Kindern häufiger beobachtet werden können (Savola, Laara et al. 2001; Vermeulen, Weets et al. 2012).

Die 1989 am Institut für Diabetesforschung in München initiierte BABYDIAB Studie beobachtet Kinder von Personen mit Typ 1 Diabetes prospektiv von Geburt an hinsichtlich der Entwicklung von Inselautoimmunität und T1DM (Hummel, Bonifacio et al. 2004).

Im Rahmen dieser Studie wurden, wie bereits weiter oben beschrieben, zwei „Inselautoimmunitäts-Wellen“ beobachtet - eine frühkindliche sowie eine prä-/pubertäre. Auch hier konnte bestätigt werden, dass das Risiko für eine Progression der Inselautoimmunität umso höher ist, je früher im Leben der erste Autoantikörper nachgewiesen wird. Bei Kleinkindern zeigen erste Auswertungen, dass die initiale Immunantwort sehr häufig gegen Insulin gerichtet ist, und sich schnell auf weitere Inselantigene ausdehnt (Ziegler, Hummel et al. 1999). Es wurde weiterhin beobachtet, dass viele dieser Kinder frühzeitig multiple Autoantikörper entwickeln und meist noch vor der Pubertät an T1DM erkranken (Hummel, Bonifacio et al. 2004).

Außerdem zeigen bisherige Daten, dass diese schnell-progressive „frühe“ Verlaufsform mit einem erhöhten Vorkommen von Diabetesrisikogenen (HLA DR3-DQ2 und /oder DR4-DQ8) assoziiert ist (Walter, Albert et al. 2003). Protektive HLA und INS VNTR III/III- Genotypen liegen dagegen nur selten vor (Walter, Albert et al. 2003). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Kinder mit Hochrisiko-Genotypen innerhalb der ersten beiden Lebensjahre oftmals hoch affine IAA entwickeln (Achenbach, Koczwara et al. 2004).

Auswertungen derselben Studie zeigen, dass Kinder die erst später im Leben Autoantikörper-positiv werden, häufig zuerst GAD-Autoantikörper aufweisen, und seltener eine schnelle Entwicklung zu multiplen Autoantikörpern und zum T1DM durchmachen (Hummel, Bonifacio et al. 2004). Walter et al. beobachteten außerdem, dass bei älteren Kindern häufiger protektive HLA und INS VNTR-Genotypen und seltener Hochrisiko-Genotypen vorliegen (Walter, Albert et al. 2003).

### Autoantikörper-Anzahl

Die Anzahl der positiven Inselautoantikörper korreliert mit dem Diabetesrisiko (Kulmala, Savola et al. 1998; Krischer, Cuthbertson et al. 2003; Hummel, Bonifacio et al. 2004). Das 10-Jahres T1DM Risiko bei Verwandten von Typ 1 Diabetikern, die nur einen Autoantikörper aufweisen, liegt bei unter 20%. Dagegen entwickelt etwa die Hälfte aller Verwandten von Typ 1 Diabetikern mit drei positiven Autoantikörpern innerhalb von 5 Jahren Diabetes (Achenbach, Warncke et al. 2004). Das Risiko für einen T1DM erhöht sich dabei zusätzlich, wenn Kinder bereits vor dem ersten bzw. zweiten Lebensjahr multiple Inselautoantikörper entwickeln (Hummel, Bonifacio et al. 2004). Auch Personen ohne familiäre Belastung haben beim Vorhandensein mehrerer Autoantikörper ein hohes T1DM Risiko (Strebelow, Schlosser et al. 1999; Schlosser, Strebelow et al. 2002). Somit markiert die Entwicklung multipler Inselautoantikörper einen bedeutenden Schritt in der Pathogenese des T1DM, der Aussagen über die Progredienz der Krankheitsentwicklung zulässt.

Im Rahmen der BABYDIAB Studie konnten bisher zwei unterschiedliche Formen von Inselautoimmunität beobachtet werden. Es gab Kinder, die zunächst nur einen Autoantikörper aufwiesen und im Verlauf eine Ausweitung auf weitere Zielantigene durchmachten. Andere Kinder wiederum wies bereits in der ersten Probe multiple Autoantikörper auf, was entweder für ein sehr rasches und nicht erfasstes Spreading oder für die gleichzeitige Entwicklung von Antikörpern spricht.

### Antigenspezifität

Auch das Zielantigen der Autoantikörperantwort beeinflusst das T1DM Risiko. So ist das Risiko einen Typ 1 Diabetes zu entwickeln bei Verwandten, die GADA oder IAA aufweisen geringer, als bei Verwandten die IA-2A aufweisen (Christie, Genovese et al. 1994; Decochez, De Leeuw et al. 2002; Achenbach, Warncke et al. 2004). Unter den IA-2A-positiven Personen haben wiederum diejenigen mit einer Reaktivität gegen IA-2 $\beta$  ein deutlich erhöhtes Risiko (Achenbach, Bonifacio et al. 2008; De Grijse, Asanghanwa et al. 2009). Auch das Auftreten von ZnT8A ist mit sehr hohem T1DM Risiko assoziiert, und etwa die Hälfte der ZnT8A positiven Kinder erkrankt innerhalb von 5 Jahren nach Auftreten der ZnT8A an Diabetes (Achenbach, Lampasona et al. 2009; De Grijse, Asanghanwa et al. 2009). Eine weitere Methode zur Stratifizierung des T1DM Risikos ist die SLC30A8 Genotypisierung bei ZnT8A-positiven Kindern (Achenbach, Lampasona et al. 2009).

So zeigen Kinder, die ZnT8A entwickeln und einen homozygoten SLC30A8 Genotyp für das R325-kodierende C-Allel oder das W325-kodierende T-Allel aufweisen im Vergleich zu ZnT8A positiven Kindern mit heterozygotem CT-Genotyp eine schnellere Progression zur klinischen Erkrankung. Eine weitere Studie lieferte Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen SLC30A8-Genotyp und dem Zeitpunkt der Manifestation des T1DM, da eine erhöhte Prävalenz des C-Allels nur bei Kindern gefunden wurde, die bereits innerhalb der ersten 5 Lebensjahre an T1DM erkrankten (Gohlke, Ferrari et al. 2008).

### Epitopspezifität

Es gibt bis heute nur sehr wenige Studien in denen die Epitop-Spezifität von Inselautoantikörpern hinsichtlich des prädiktiven Wertes für T1DM untersucht wurde.

Achenbach et al. zeigten 2004, dass eine IAA-Reaktivität gegen das Proinsulin mit einem sehr hohen Risiko für die Progression der Inselautoimmunität assoziiert ist, wohingegen IAA die nicht Proinsulin binden mit einem geringeren Risiko assoziiert sind (Achenbach, Koczwara et al. 2004).

Eine ähnliche Assoziation zwischen Epitopreaktivität und T1DM-Risiko konnte für GADA gezeigt werden. In dieser Studie waren GADA, die eine Reaktivität gegenüber der mittleren und/oder COOH-terminalen Region des GAD65 Moleküls aufwiesen mit einem höheren Risiko für T1DM assoziiert als NH<sub>2</sub>-reaktive GADA (Mayr, Schlosser et al. 2007). In einer weiteren Untersuchung von GAD-Epitopen bei Kindern der BABYDIAB Studie wurde häufig eine Ausweitung der Antikörper-Reaktivität von mittleren und c-terminalen Epitopen hin zu n-terminalen Epitopen beobachtet. Bezüglich der IA-2A Epitopspezifitäten zeigten erste Auswertungen, dass IA-2A positive Kinder häufig intramolekulares Spreading aufweisen und dass Reaktivität gegen die juxtamembranäre Region von IA-2 mit einem signifikant erhöhten Diabetesrisiko assoziiert ist (Naserke, Ziegler et al. 1998). In derselben Untersuchung zeigten ältere erstgradige Verwandte dagegen nur selten ein Epitop-Spreading. In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass Reaktivität gegen mehr als ein IA-2 Epitop mit einem erhöhten Risiko verbunden ist (Bonifacio, Lampasona et al. 1998).

Bezüglich der ZnT8A-Isoformen konnte eine Studie von 2009 zeigen, dass eine restringierte Reaktivität gegen eine der zwei ZnT8A-Isoformen (R325 oder W325), bei homozygotem SLC30A8 Genotyp, mit einer schnelleren Diabetes-Progression assoziiert war als eine heterozygote Autoimmunantwort gegen beide Isoformen (Achenbach, Lampasona et al. 2009).

### Autoantikörperaffinität

Die Bindungsstärke eines Antigen-Antikörper-Komplexes besteht aus elektrostatischen und hydrophobischen Wechselwirkungen. Autoantikörperaffinität ist ein Maß für die Bindungsstärke eines Antikörpers an ein bestimmtes Epitop des Antigens und kann Anhand der Dissoziationskonstante in-vitro bestimmt werden (Torres and Casadevall 2008).

Auswertungen der BABYDIAB Studie identifizierten die Autoantikörperaffinität von IAA und GADA als neue prädiktive Marker zur weiteren Stratifizierung des T1DM Risikos (Achenbach, Koczwara et al. 2004; Schlosser, Koczwara et al. 2005; Mayr, Schlosser et al. 2007). Das Auftreten von hoch affinen Inselautoantikörpern war in diesen Arbeiten mit einer Progression der Inselautoimmunität zu multiplen AAK und zum T1DM verbunden. Dagegen waren niedrig affine Autoantikörper nicht mit einer Ausweitung der Immunreaktion auf multiple Zielantigene assoziiert. Somit kann Anhand der Autoantikörper Affinität zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens der Antikörper eine Voraussage über den Verlauf der Krankheitsentwicklung getroffen werden.

### Autoantikörpertiter

Eine Assoziation zwischen hohen Inselzell-Autoantikörpertitern und einem erhöhten T1DM-Risiko wurde bereits 1990 von Bonifacio et al. beschrieben (Bonifacio, Bingley et al. 1990). Eine Arbeit von 2004 bei Verwandten von Typ 1 Diabetikern zeigte für hohe IAA- und IA-2A-Titer ein erhöhtes T1DM Risiko. So hatten IA-2A positive Verwandte mit hohen Titern ein signifikant höheres 10-Jahres T1DM Risiko als Verwandte mit niedrigen Titern (79% vs. 20%) und IAA positive Verwandte mit hohen Titern hatten im Vergleich mit Personen mit niedrigen IAA Titern auch ein höheres Risiko innerhalb von 10 Jahren einen T1DM zu entwickeln (77% vs. 37%). Dagegen zeigten hohe GADA Titer keine Assoziation mit einem erhöhten T1DM Risiko (Achenbach, Warncke et al. 2004)

## 4. Materialien und Methoden

### 4.1 Untersuchungsgruppen

Für die vorliegende Arbeit wurden Probanden aus dem Kollektiv der Deutschen BABYDIAB Studie ausgewählt. Dies ist die weltweit erste prospektive Kohortenstudie, die von Frau Professor Ziegler geleitet wird und die Entwicklung von Inselzell-Autoantikörpern und Diabetes bei Kindern von Eltern mit Typ 1 Diabetes verfolgt (Ziegler, Hillebrand et al. 1993). In den Jahren 1989-2000 wurden insgesamt 1650 Neugeborene aus Familien mit mindestens einem an T1D erkrankten Elternteil rekrutiert. Blutproben werden bei Geburt (Nabelschnurblut), im Alter von 9 Monaten, sowie 2, 5, 8, 11, 14, 17 und 20 Jahren gesammelt und auf Inselautoantikörper (ICA, IAA, GADA, IA-2A, ZnT8A) untersucht. Bei Kindern, die Inselautoantikörper entwickelt haben, erfolgt die Untersuchung im halbjährlichen bzw. jährlichen Intervall. Zusätzlich werden bei diesen Kindern regelmäßig die Nüchternblutglukosewerte und HbA1c-Werte kontrolliert sowie bei Kindern mit multiplen Inselautoantikörpern ab dem Alter von 3 Jahren ein oraler Glukosetoleranztest empfohlen. Bei jeder Verlaufsuntersuchung werden Angaben zu klinischen, demographischen und exogenen Faktoren erfragt (z.B. Größe, Gewicht, Pubertätsentwicklung, Erkrankungen, Impfungen, Ernährungsfaktoren). Weiterhin wurden bei allen Kindern Diabetes-assoziierte genetische Risikomarker bestimmt (alle bekannten T1D und T2D Risikogene). Die Studie wurde von der Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer gebilligt (Nr. 95357).

Insgesamt wurden aus dem BABYDIAB Kollektiv 142 bestätigt Autoantikörper-positive Verwandte für die vorliegende Studie ausgewählt.

Die Ergebnisse des Autoantikörperscreenings sowie der genetischen Untersuchungen standen für die Analyse der vorliegenden Arbeit zur Verfügung. Als bestätigt Autoantikörper-positiv galten Reaktivität gegen mindestens einen Antikörper (IAA, GADA, IA-2A, oder ZnT8A) in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Serumproben. Die Personen wurden bis zu deren Diabetes Manifestation oder bis zum letzten Kontakt im September 2009 (Studienendpunkt) nachverfolgt. Die mediane Nachverfolgungszeit von der ersten Autoantikörper-positiven Serumprobe betrug 11,7 Jahre (25.-75. Quartile 9,2-14,6 Jahre). Bis zum Studienende hatten insgesamt 44 Verwandte (30,9%) einen Typ 1 Diabetes entwickelt.

Die 142 bestätigt Autoantikörper-positiven Kinder wurden zur vergleichenden Analyse der Autoantikörperprofile in zwei Gruppen unterteilt. In die erste Gruppe wurden Personen eingeteilt, bei denen Autoantikörper bereits im Kleinkindesalter, vor dem 4. Lebensjahr, auftraten (frühkindliche = **Early** Inselautoimmunität). Hierzu gehörten 62 Kinder.

Die anderen 80 Kinder, bei denen Autoantikörper erst mit 4 Jahren oder später auftraten (prä/-pubertäre = **Late** Inselautoimmunität), wurden in die zweite Gruppe eingeteilt.

In Tabelle 1 sind die Charakteristika des untersuchten Kollektivs zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 1** Charakterisierung der untersuchten Kohorte

	<b>Early</b> <b>&lt; 4 Jhr.</b>	<b>Late</b> <b>≥ 4 Jhr.</b>	
<b>Alter bei 1. pos. Ak</b>			
<b>Medianes Alter* bei 1. pos. Ak</b>	1,9 (1,0-2,1)	8,0 (5,1-8,4)	
<b>Anzahl der Kinder</b>	62	80	
<b>Vater/ Mutter/ beide mit T1D</b>	22/36/4	24/55/1	
<b>Mediane Follow-up-Zeit* nach 1. Ak</b>	7,3 (3,0-9,9)	5,4 (3,7-7,8)	p=0,1
<b>Diabetes entwickelt</b>	36 (58%)	8 (10%)	p<0,0001

\* in Jahren (25.-75. Quartile)

## 4.2 Materialien

### 4.2.1 Chemikalien, Reagenzien

<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Sigma-Aldrich
Lumasafe™	Lumac LSC
Microscint™ 40	Perkin Elmer
NaCl	Sigma-Aldrich
Protein-A-Sepharose™ CL-4B	GE Healthcare
Trizma® Base	Sigma-Aldrich
Tween® 20	Sigma-Aldrich

### 4.2.2 Puffer

TBST	20 mmol/l Tris 150 mmol/l NaCl 0,15 % Tween® 20 pH 7,4
TBST/BSA	20 mmol/l Tris 150 mmol/l NaCl 0,15 % Tween® 20 0,1 % BSA pH 7,4

### 4.2.3 Geräte und Gebrauchsgegenstände

AC 88 Delta Range® Feinwaage	Mettler
Allegra™ X-12R Centrifuge	Beckman Coulter
Centrifuge 5415C	Eppendorf
COBRA™ II (Gammazähler)	Packard
Mehrkanalaufsatz ( <i>Multiwell Plate Washer</i> )	Sigma-Aldrich
Mehrkanalspender ( <i>Dispenser Manifo</i> )	Sigma-Aldrich

Schüttler, VIBRAX	IKA®
Top count (Mikrotiterplatten-Szintillationszähler)	Packard
TRI-CARB 2900TR ( $\beta$ -Szintillationszähler)	Packard
Vortexer, Reax 2000	Heidolph
Vakuumpumpe UNO 004B	Pfeiffer Balzers

#### 4.2.4 Verbrauchsmaterialien, Kit

NAP™-5 Columns (Gelchromatographiesäulen)	GE Healthcare
TNT SP6 Quick Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
Klebefolie, TopSeal® -A: 96 well Microplattes	Perkin Elmer
96-well Mikrotiterplatte, Optiplatte	Perkin Elmer
Pony Vial	Perkin Elmer
5 mL Rundbodenröhrchen ( <i>tube</i> )	Peske
96-deep-well-Platte	Beckman Coulter

## **4.3 Methoden**

### **4.3.1 Radioimmunoassays**

Autoantikörper gegen IAA, GADA, IA-2A und ZnT8A wurden im Rahmen der BABYDIAB Studie bei allen Teilnehmern bestimmt. Bei positivem Befund wurden Epitopspezifitäten von GADA und IA-2A bestimmt.

#### **4.3.1.1 Bestimmung der Autoantikörper GADA, IA-2A und ZnT8A**

Herstellung von [<sup>35</sup>S]-markiertem Antigen und Radioimmunoassay

GADA, IA-2A, sowie Antikörper gegen die beiden c-terminalen Varianten ZnT8R und ZnT8W wurden mit Radioimmunoassays unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin-markiertem, in vitro translatiertem rekombinatem GAD 65, IA-2 und ZnT8 bestimmt (Ziegler, Hummel et al. 1999; Achenbach, Lampasona et al. 2009). Die Grenzen für Positivität wurden anhand der 99. Perzentile eines Kontrollkollektivs festgelegt.

Die Schwellenwerte betragen 8,5 units (25 WHO U/ml) für GADA, 2,5 units (4 WHO U/ml) für IA-2A, 16 units/ml für ZnT8RA und 30 units/ml für ZnT8WA. Bei Verwendung dieser Grenzwerte für Positivität, zeigten die Assays im dritten DASP Proficiency Workshop (Torn, Mueller et al. 2008) Sensitivitäten und Spezifitäten von 86% und 93% für GADA und 72% und 100% für IA-2A, und im DASP Workshop für ZnT8A 68% und 100% für ZnT8RA und 52% und 100% für ZnT8WA (Lampasona, Schlosser et al. 2011).

#### **4.3.1.2 Bestimmung der Autoantikörper gegen Insulin**

Autoantikörper gegen Insulin (IAA) wurden unter Verwendung von <sup>125</sup>I-markiertem Insulin im micro-IAA-Assay gemäß der beschriebenen Methodik bestimmt (Williams, Bingley et al. 1997; Naserke, Bonifacio et al. 1999). Die Grenze für Positivität wurde wie bei den anderen Autoantikörpern anhand der 99. Perzentile eines Kontrollkollektivs festgelegt. Der Schwellenwert für IAA betrug 1,5 units. Bei Verwendung dieses Grenzwertes für Positivität, zeigten die Assays im DASP Proficiency Workshop von 2005 Sensitivitäten und Spezifitäten von 57% und 99% für IAA (Schlosser, Mueller et al. 2010).

#### 4.3.1.3 Bestimmung der Epitopspezifität von GADA

Autoantikörper gegen GAD 65-Epitope wurden mit Protein-A-Sepharose Radioimmunoassays unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin-markiertem rhGAD65/67 chimären Konstrukten bestimmt.

Folgende chimäre Konstrukte wurden für die Bestimmung von Autoantikörpern gegen Epitope von GAD verwendet (Bonifacio, Lampasona et al. 2000):

GAD 65<sub>1-95</sub>/GAD 67<sub>102-593</sub> (n-terminaler Teil von GAD 65, GAD-NH<sub>2</sub>, AS 1-95),

GAD 67<sub>1-101</sub>/GAD 65<sub>235-444</sub>/GAD 67<sub>453-593</sub> (mittlerer Teil von GAD 65, GAD-MID, AS 235-444),

sowie GAD 67<sub>1-452</sub>/GAD 65<sub>445-585</sub> (c-terminaler Teil von GAD 65, GAD-COOH, AS 445-585).

Zusätzlich wurden Autoantikörper gegen GAD 67 (AS 1-593) bestimmt

##### Herstellung des [<sup>35</sup>S]-markierten Antigens

Zur Messung der Epitopspezifitäten von Autoantikörpern gegen GAD 65 wurde gereinigte Plasmid DNA der GAD-Konstrukte durch Quantum Prep Spin Column Präparation (Bio-Rad, Hercules, CA) hergestellt, in vitro unter Verwendung des TnT™ SP6 Coupled Retikulozyten Lysat Systems in Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]-Methionin (Amersham International, Bucks, UK) transkribiert und translatiert (Bonifacio, Lampasona et al. 2000).

2 µl DNA wurden dem Reaktionsmix zugegeben und der fertige Ansatz für 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 100 µl TBST-Puffer (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,15% Tween 20, pH 7,4) gestoppt und überschüssiges [<sup>35</sup>S]-Methionin auf Gelchromatographiesäulen abgetrennt. Zur Bestimmung der spezifisch gebundenen Aktivität wurden 2 µL Antigen in 2 ml Lumasafe™-Szintillationsflüssigkeit pipettiert und in einem β-Szintillationszähler gemessen. Das radioaktiv markierte Antigen wurde entweder direkt im Radioimmunoassay verwendet oder bei -80 °C gelagert.

##### Radioimmunoassay

Jeweils 2 µl Patientenserum wurden im Doppelansatz in die wells einer 96er deep well Platte pipettiert. Dazu wurden pro well 25 µl TBST/BSA-Puffer (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,15% Tween 20, 0,1% BSA, pH 7,4)-Antigen-Gemisch (ca. 20.000-25.000 cpm/well des [<sup>35</sup>S]-Methionin-markierten Antigens) zugegeben und der Ansatz über Nacht auf Eis bei 4°C inkubiert. Zur Isolierung der Immunkomplexe vom radioaktiven nicht gebundenen Antigen wurden pro well 1,5 mg vorgequollene Protein-A-Sepharose in 50 µl TBST/BSA-Puffer hinzugefügt. Der Ansatz wurde dann für 1 Stunde bei 4°C schüttelnd inkubiert.

Anschließend wurden die Sepharose-Ag-Ak-Komplex zur Entfernung der ungebundenen Radioaktivität auf Eis mit kaltem TBST-Puffer fünfmal gewaschen.

Bei jedem Waschgang wurden 800 µl TBST-Puffer mit einem Mehrkanalspender zugegeben, die Platten für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit einem Mehrkanalaufsatz bis auf 100 µl abgesaugt. Nach dem letzten Waschgang wurden die Sepharose-Ag-Ak-Komplexe im verbleibenden TBST-Puffer resuspendiert und in eine 96er well Mikrotiterplatte überführt.

Dann erfolgte die Zugabe von 150 µl Microscint TM-Szintillationsflüssigkeit pro well.

Die Platten wurden mit Klebefolie verschlossen und mit Alufolie gegen Licht geschützt.

Abschließend wurden die Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die cpm der gebundenen Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Top Count; Packard) gemessen.

Die Ergebnisse wurden als units anhand einer Standardkurve ermittelt, die in jedem Testansatz mitgemessen wurde. Diese bestand aus einer aufsteigenden Verdünnungsreihe einer GADA positiven Serumprobe.

Die Grenzwerte für positive Messwerte wurden als oberer Wert 50 Kontrollseren festgelegt. Die Grenze für Positivität lag für GADA-COOH bei 8 U, für GADA-MID bei 15 U und für GADA-NH<sub>2</sub> bei 10 U.

#### **4.3.1.4 Bestimmung der Epitopspezifität von IA-2A**

Folgende IA-2/IA-2β Konstrukte wurden für die Bestimmung von Autoantikörpern gegen Epitope von IA-2 verwendet (Bonifacio, Lampasona et al. 1998): IA-2<sub>605-979</sub> (IA-2ic) zur Bestimmung von IA-2 Autoantikörpern, IA-2<sub>605-682</sub> (IA-2-JM), zur Identifikation von Autoantikörpern die mit der juxtamembranären Region von IA-2 reagieren, IA-2<sub>687-979</sub> (IA-2-PTP) zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen die PTP-Region von IA-2, und IA-2β<sub>741-1033</sub> zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen IA-2β. Diese Konstrukte wurden in den pSP64 polyA (IA-2ic) oder pGEM-T (IA-2-JM, IA2-PTP, IA-2β) Klonierungsvektoren (Promega) unter Kontrolle des SP6 Promoters analog zu der in 2.1.1.3. beschriebenen Markierungsmethode hergestellt. Der Assay zur Bestimmung der Epitop-Spezifität von Antikörpern gegen IA-2 wurde ebenfalls analog zu den in 2.1.1.3. beschriebenen Radioimmunoassays durchgeführt. Die 99. Perzentile von 80 Kontrollseren wurde für jedes Konstrukt als Grenzwert für Positivität verwendet. Die Grenze für Positivität lag für IA-2-JM bei 11 U, für IA-2-PTP und IA-2β bei jeweils 3 U.

### **4.3.2 Bestimmung der IAA-, GADA-, und IA-2A-Affinitäten**

Die Affinitäten der Autoantikörper IAA, GADA und IA-2A wurden mit Hilfe eines kompetitiven Protein-A-basierten Radioimmunoassays unter Verwendung von <sup>125</sup>I-markiertem rh-Antigen bestimmt (Achenbach, Koczwara et al. 2004; Mayr, Schlosser et al. 2007).

### **4.3.3 Bestimmung der Genotypen**

#### **HLA- Genotypisierung**

Die HLA-DRB1-DQB1 Genotypisierung wurde mit Hilfe einer durch Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten DNA und nicht radioaktiven sequenzspezifischen Oligonukleotiden durchgeführt (Walter, Albert et al. 2003).

#### **SLC30A8- Genotypisierung**

Genomische DNA wurde aus heparinisiertem Blut extrahiert und dann einer Genotypisierung von single-nucleotide polymorphism (SNP) rs 13266634, welche für die polymorphen Varianten an Stelle aa325 von ZnT8 arg oder trp kodiert, mittels Taqman assay (assay ID C\_357888\_10; Applied Biosystems, Monza, Italien), gemäß den Instruktionen des Herstellers mit Hilfe eines ABI 7000 (ABI, Waltham, MA, USA), unterzogen (Achenbach, Lampasona et al. 2009).

#### **INS VNTR- Genotypisierung**

Die INS VNTR- Genotypisierung wurde mit Hilfe von HpaI Aufschluss von durch Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten Produkten der spezifischen Regionen durchgeführt (Walter, Albert et al. 2003).

#### **4.4 Analyse-Plan**

Bei der Analyse der Daten wurde in der vorliegenden Arbeit folgendermaßen vorgegangen:

Zunächst wurden für beide Gruppen initiale Immunisierungsmuster durch Betrachtung von Autoantikörper-Anzahl, -spezifität, und -titer zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von Inselautoantikörpern (IAA, GADA, IA-2A und/oder ZnT8A) untersucht und verglichen. Durch die prospektive Beobachtung der Studienteilnehmer von Geburt an war es möglich, das Alter bei Serokonversion (Konversion von Autoantikörper-negativ zu -positiv) sowie das/die initiale(n) Zielantigen(e) zu bestimmen. Antigenspezifische Immunisierungsmuster (Autoantikörper gegen Epitope der verschiedenen Zielantigene und Affinität) wurden in den zwei Gruppen zum Zeitpunkt des Neuauftritts von Autoantikörpern gegen ein spezifisches Beta-Zell-Antigen (Insulin, GAD 65, IA-2 oder ZnT8) analysiert, um eine größere Gruppenstärke zu erzielen. Die erste für das jeweilige Zielantigen Autoantikörper-positivem Verlaufsprobe konnte, aber musste dabei nicht mit der ersten Inselautoantikörper-positiven Probe identisch sein. Antikörper-Merkmale wurden mittels klassischer nicht-parametrischer Tests statistisch ausgewertet. Kurzfristige Progressionsmuster wurden ausgehend von den initialen Immunisierungsmustern/Antigen-spezifischen Immunisierungsmustern im Verlauf von ein bis zwei Jahren analysiert, und zwischen den beiden Gruppen verglichen. Es wurden qualitative und quantitative Veränderungen der Autoantikörper-profile im Verlauf betrachtet. Dabei wurde bei Betrachtung von Ak-Anzahl, -spezifität und -titer der Verlauf ein bis zwei Jahre nach Serokonversion untersucht. Für Epitope und Affinität wurde die Progression ein bis zwei Jahre nach dem erstmaligen Auftreten des jeweiligen Autoantikörpers beobachtet. Anhand der Veränderungen wurden Immunisierungsmuster identifiziert, die mit persistent/progressiven, oder persistent/nicht-progressiven Autoantikörperverläufen assoziiert sind. Die Untersuchung einer Assoziation zwischen T1DM- relevanten Genotypen und dem Progress zu multiplen Autoantikörpern bzw. bei dem Vergleich der beiden untersuchten Gruppen (Early und Late) in Bezug auf Progression zu multiplen AAK und schließlich zum T1DM erfolgte unter Betrachtung des gesamten Nachverfolgungszeitraumes.

#### **4.5 Statistik**

Mittels Fisher's-Exakt Test oder Chi-Quadrat Test wurden Prävalenzen zwischen zwei Gruppen verglichen. Der Mann-Whitney-U Test wurde verwendet, um kontinuierliche Variablen zwischen zwei Gruppen zu vergleichen. Zum Vergleich kontinuierlicher Variablen zwischen mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt, und ein Vergleich von Autoantikörpern im Verlauf erfolgte mittels Wilcoxon-signed-rank Test.

Das kumulative Risiko für die Entwicklung multipler Autoantikörper oder eines T1DM wurde mit Lifetable Analysen berechnet. Bei der Berechnung des kumulativen Risikos für multiple Autoantikörper, begann die Follow-up-Zeit mit dem Datum des ersten detektierten positiven Autoantikörpers und endete mit dem Tag der Manifestation multipler Autoantikörper bzw. mit dem Datum der letzten gemessenen Serumprobe. Zur Analyse des kumulativen Risikos für T1DM begann die Follow-up-Zeit mit dem Datum des ersten detektierten Autoantikörpers und endete mit dem Tag der Diabetesmanifestation, oder mit dem Tag des letzten Kontakts (01. September 2009). Mit dem Wilcoxon- (Gehan-) Test wurden Unterschiede im kumulativen Risiko multiple Antikörper bzw. T1DM zu entwickeln berechnet. Bei allen Analysen galt ein P-Wert von  $< 0,05$  als signifikant. Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Softwarepaket „graph pad prism 3.03“ und mit dem „Statistical Package for Social Sciences“ (SPSS 18.0) durchgeführt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Initiale Immunisierungsmuster in Abhängigkeit vom Alter bei Serokonversion

Autoantikörper-Anzahl, -Prävalenz und Titer von IAA, GADA, IA-2A und ZnT8A wurden bei 62 Kindern der Early Gruppe und 80 Kindern der Late Gruppe analysiert.

#### 5.1.1 Autoantikörperanzahl und -Prävalenz

Beim erstmaligen Auftreten von Insel-Autoimmunität (= bei Serokonversion) hatten 35 Kinder (56,5%) der Early Gruppe und 63 Kinder (78,8%) der Late Gruppe nur einen Autoantikörper. Multiple ( $\geq 2$ ) Autoantikörper kamen innerhalb der Early Gruppe mit 27 Personen (43,5%) signifikant häufiger vor als innerhalb der Late Gruppe (17 Personen (21,2%)) ( $p=0,004$ ).

Bei beiden Gruppen waren IAA und GADA in der ersten Autoantikörper-positiven Probe die am häufigsten vorkommenden Autoantikörper. IAA hatte vor allem bei Kindern der Early Gruppe die höchste Prävalenz. Innerhalb der Late Gruppe war die Immunantwort meistens gegen GAD gerichtet (Tab. 2). Autoantikörper gegen IA2 und ZnT8 kamen in beiden Gruppen seltener vor, und wurden fast ausschließlich bei Personen mit multiplen Autoantikörpern beobachtet (Tab. 2).

Die Prävalenzen der einzelnen Autoantikörper bei Serokonversion innerhalb der Early und der Late Gruppe sind zusammenfassend in Tabelle 2 dargestellt. Es wird auch der Autoantikörper-Status (singulär-Ak positiv/ multiple Ak) berücksichtigt.

**Tabelle 2** Prävalenzen der Autoantikörper bei Serokonversion (= erstmaliges Auftreten von Insel-Autoimmunität) innerhalb der Early und Late Gruppe

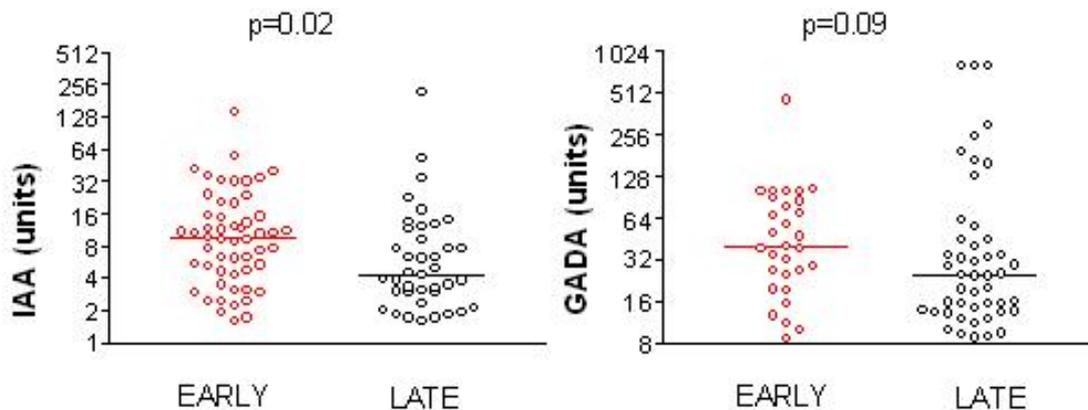
	<u>Gesamt</u>			<u>Singulär Ak pos.</u>			<u>Multiple Ak</u>		
	<u>Early</u> (n = 62)	<u>Late</u> (n = 80)		<u>Early</u> (n = 35)	<u>Late</u> (n = 63)		<u>Early</u> (n = 27)	<u>Late</u> (n = 17)	
<b>IAA</b>	54 (87,1%)	39 (48,8%)	<b>P&lt;0,0001</b>	28 (80%)	28 (44,4%)	<b>p=0,0007</b>	26 (96,3%)	11 (64,7%)	<b>p=0,009</b>
<b>GADA</b>	30 (48,4%)	47 (58,8%)	p = 0,2	5 (14,3%)	33 (52,4%)	<b>p=0,0002</b>	25 (92,6%)	14 (82,4%)	p=0,4
<b>IA-2A</b>	10 (16,1%)	7 (8,8%)	p = 0,2	0	2 (3,2%)	p=0,1	10 (37%)	5 (29,4%)	p=0,7
<b>ZnT8A</b>	14 (22,6%)	13 (16,3%)	p = 0,3	2 (5,7%)	0	p=0,5	12 (44,4%)	13 (76,5%)	p=0,06

### 5.1.2 Autoantikörper-Titer

Zur Veranschaulichung der Intensität der Autoantikörper-Antwort wurden in beiden Gruppen die Titer von IAA, GADA, IA-2A und ZnT8A beim erstmaligen Auftreten von Insel-Autoimmunität miteinander verglichen.

Kinder der Early Gruppe (Median der Titer: 9,4 units; IQR 4,4-17,5) zeigten bei Serokonversion signifikant höhere IAA-Titer als Kinder der Late Gruppe (Median der Titer: 4,3 units; IQR 2,9-11,5) (p=0,02) (Abb.2).

Die Titer von GADA, IA-2A und ZnT8A unterschieden sich in den beiden Gruppen nicht signifikant (p=0,09 für GADA; p=0,4 für IA-2A; p=0,1 für ZnT8A-Arginin und p=1,0 für ZnT8A-Tryptophan).



**Abbildung 2** IAA- und GADA-Titer bei Serokonversion (= erstmaliges Auftreten von Insel-Autoimmunität) innerhalb der Early und Late Gruppe

## 5.2 Antigen-spezifisches Immunisierungsmuster in Abhängigkeit vom Alter

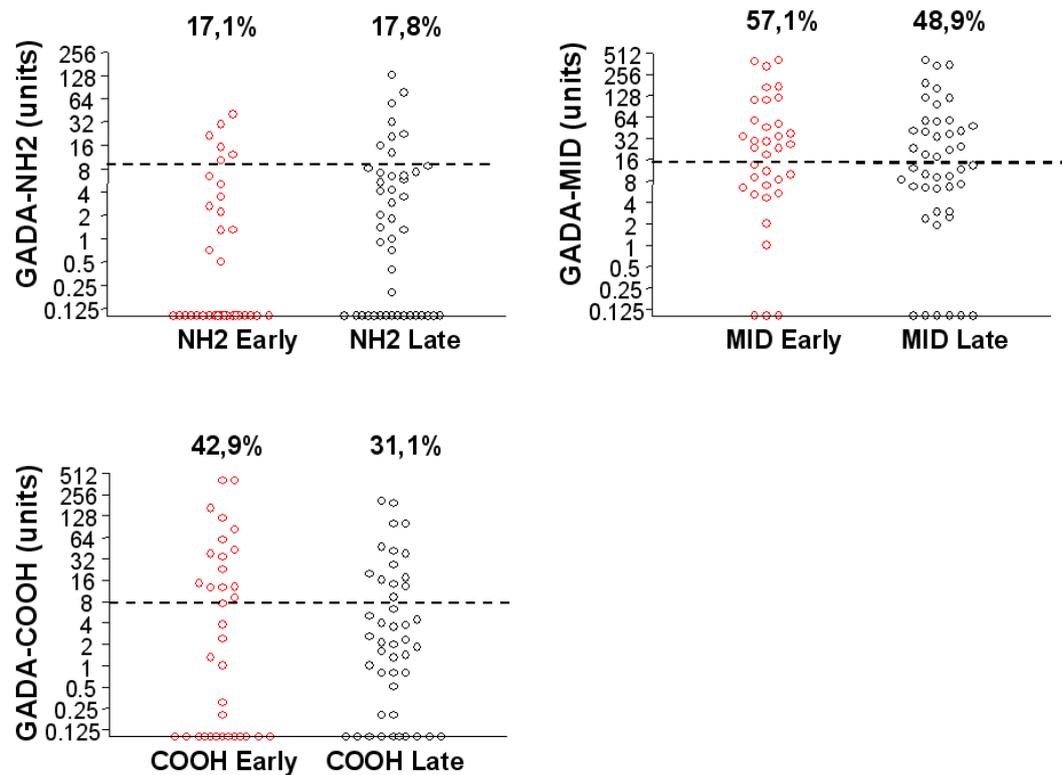
### 5.2.1 Epitop-Spezifitäten beim erstmaligen Auftreten von GADA, IA-2A und ZnT8A

#### Epitope von GAD 65

Autoantikörper gegen drei Epitop-Regionen von GAD 65 (NH<sub>2</sub>, MID, COOH) wurden in beiden Gruppen zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von GADA bestimmt. Hierbei wurde der gesamte Beobachtungszeitraum berücksichtigt. Im gesamten Beobachtungszeitraum entwickelten insgesamt 48 der Early Gruppe Ak gegen GAD. Von diesen 48 Kindern standen 35 Serumproben zur Epitopmessung zur Verfügung, und von den insgesamt 53 GADA positiven Kindern der Late Gruppe waren 45 Serumproben verfügbar. Das mediane Alter beim erstmaligen Auftreten von GADA betrug 2,1 Jahre bei Kindern der Early Gruppe und 8,0 Jahre bei Kindern der Late Gruppe.

In beiden Gruppen erkannten GAD-spezifische Autoantikörper in der Mehrheit der Fälle die mittlere (GAD-MID) und die c-terminale Region (GAD-COOH) des Moleküls. Dagegen wurde die n-terminale Region (GAD-NH<sub>2</sub>) seltener erkannt (Abb. 3). 13 Personen (37,1%) der Early Gruppe zeigten keine Reaktivität gegen die verwendeten Konstrukte trotz GADA-Positivität; innerhalb der Late Gruppe waren es 14 Personen (31,1%), die keine Autoantikörper gegen die verwendeten Konstrukte aufwiesen.

Es gab zwischen der Early und der Late Gruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Prävalenzen von Antikörpern gegen Epitope von GAD 65 (Abb. 3).

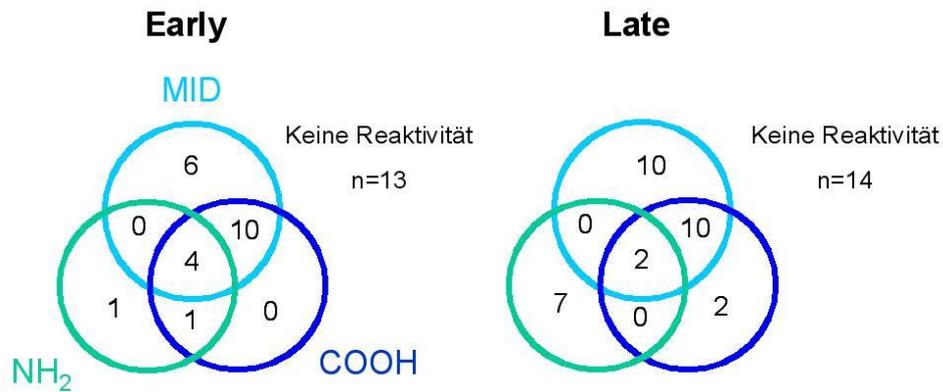


**Abbildung 3** Titer der drei GAD-Epitope (NH<sub>2</sub>, MID und COOH) in der Early und Late Gruppe in der jeweils ersten GADA-positiven Serumprobe (im gesamten Beobachtungszeitraum); die gestrichelte Linie markiert den jeweiligen Cut-off (NH<sub>2</sub>: 10 U; MID: 15 U; COOH: 8 U); Prozentzahlen über den Punktwolken geben die Prävalenzen der Epitop-spezifischen Ak wieder; die Titer der Epitop-spezifischen Ak unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant

Folgende Epitop-Verteilungsmuster kamen in beiden Gruppen häufig vor (Abb. 4): Reaktivität gegen **GAD-COOH** und **GAD-MID** sowie restringierte Reaktivität gegen **GAD-MID** waren die häufigsten Epitop-Kombinationen.

Restringierte Reaktivität gegenüber **GAD-NH<sub>2</sub>** kam in beiden Gruppen seltener vor, innerhalb der Late Gruppe jedoch häufiger als innerhalb der Early Gruppe ( $p=0,07$ ). Restringierte GAD-NH<sub>2</sub> Reaktivität war ausschließlich mit singulärer GADA-Reaktivität assoziiert. Unter den im gesamten Beobachtungszeitraum getesteten 80 GADA-positiven Serumproben beider Gruppen gab es 33 singulär GADA positive Kinder; davon zeigten 8 Kinder (24,2%) restringierte Reaktivität gegenüber GAD-NH<sub>2</sub>.

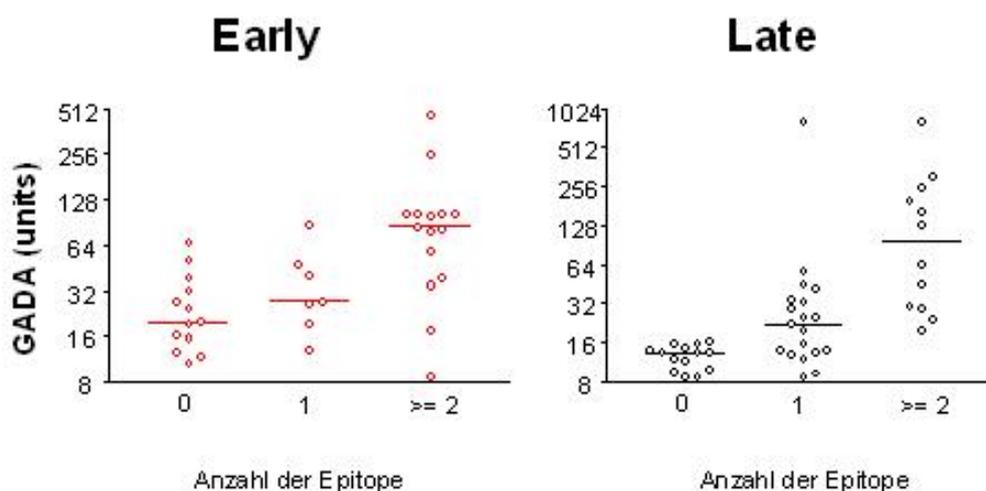
Von den insgesamt 47 GADA positiven Personen (Early und Late) mit multiplen Autoantikörpern beim erstmaligen Auftreten von GADA, zeigte dagegen keine einzige Person eine restringierte GAD-NH<sub>2</sub> Reaktivität ( $p=0,0005$ ).



**Abbildung 4** GAD-Epitop-Verteilungsmuster bei Early und Late in der jeweils ersten GADA-positiven Serumprobe (im gesamten Beobachtungszeitraum)

Reaktivität gegen multiple GAD-Epitope trat bei 15 Kindern (42,9%) der Early Gruppe und bei 12 Kindern (26,7%) der Late Gruppe auf ( $p = 0,2$ ).

Reaktivität gegen mehrere Epitope war in beiden Gruppen signifikant mit einem höheren GADA-Titer assoziiert (Early Gruppe:  $p = 0,003$ ; Late Gruppe:  $p < 0,0001$ ) (Abb. 5).

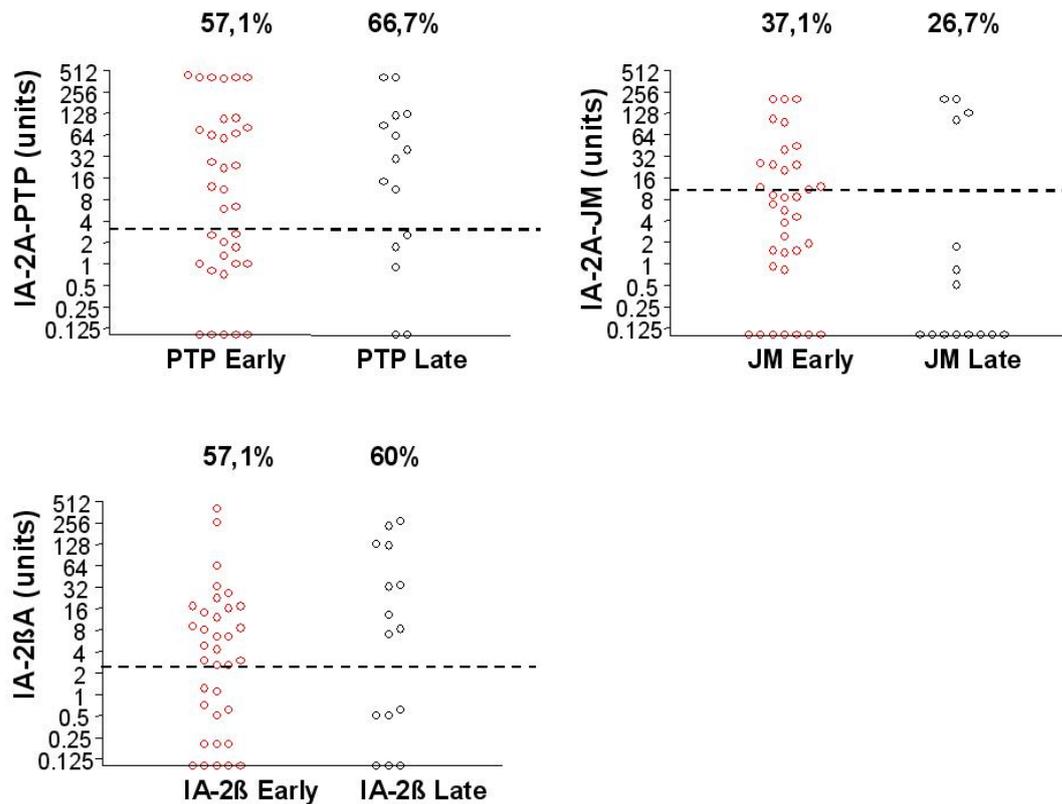


**Abbildung 5** Beziehung zwischen der GAD-Epitop-Anzahl und dem GADA Titer bei Early und Late in der jeweils ersten GADA-positiven Serumprobe (im gesamten Beobachtungszeitraum)

### **Epitope von IA-2**

Autoantikörper gegen drei Epitop-Regionen von IA-2 (JM, PTP, IA-2 $\beta$ ) wurden in beiden Gruppen zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von IA-2A bestimmt. Hierbei wurde der gesamte Beobachtungszeitraum berücksichtigt. Im gesamten Beobachtungszeitraum entwickelten insgesamt 38 Kinder der Early Gruppe IA-2A. 35 Serumproben der insgesamt 38 IA-2A positiven Kinder der Early Gruppe standen zur Epitopmessung zur Verfügung; von den insgesamt 16 IA-2A positiven Kindern der Late Gruppe waren 15 Serumproben verfügbar. Das mediane Alter beim erstmaligen Auftreten von IA-2A betrug 2,6 Jahre bei Kindern der Early Gruppe und 8,3 Jahre bei Kindern der Late Gruppe.

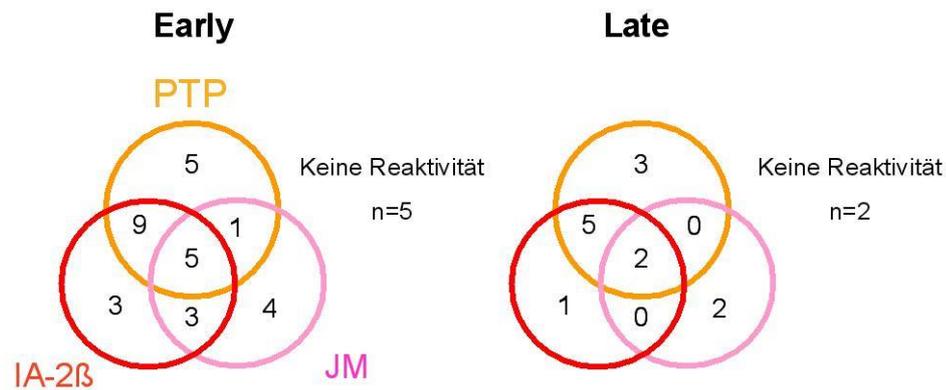
In beiden Gruppen erkannten IA-2-spezifische Autoantikörper am häufigsten die PTP-Region von IA-2 und IA-2 $\beta$ . Reaktivität gegen die JM-Region von IA-2 kam seltener vor (Abb. 6). Fünf Kinder (14,3%) der Early Gruppe und 2 Kinder (13,3%) der Late Gruppe zeigten trotz IA-2A-Positivität keine Reaktivität gegen die verwendeten Konstrukte. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Early und der Late Gruppe bezüglich der Prävalenzen von Antikörpern gegen Epitope von IA-2 (Abb. 6).



**Abbildung 6** Titer der drei IA-2-Epitope (PTP, JM und IA-2β) in der Early und Late Gruppe in der jeweils ersten IA-2A-positiven Serumprobe (im gesamten Beobachtungszeitraum); die gestrichelte Linie markiert den jeweiligen Cut-off (PTP : 3 U; JM: 11 U; IA-2β: 3 U); Prozentzahlen über den Punktwolken geben die Prävalenzen der Epitop-spezifischen Ak wieder; die Titer der Epitop-spezifischen Ak unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant

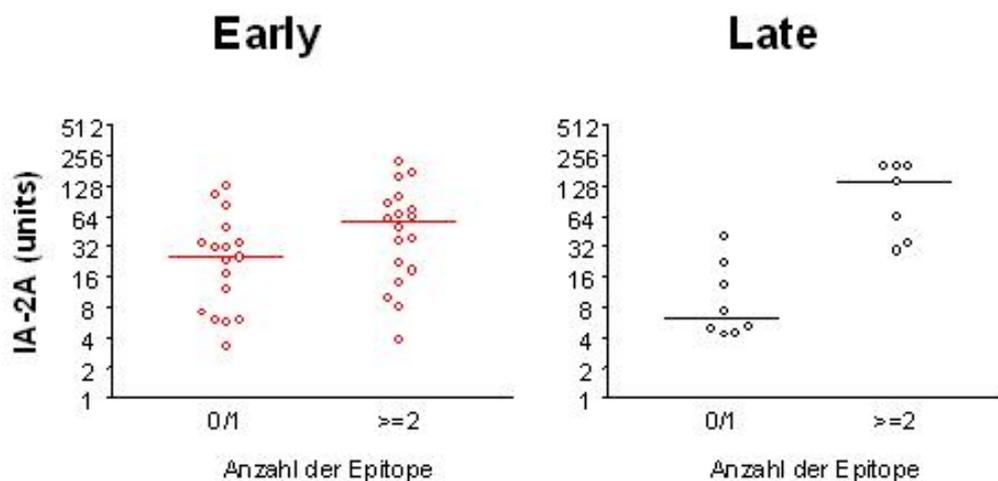
In beiden Gruppen wurden am häufigsten folgende Epitop-Verteilungsmuster beobachtet (Abb. 7): Reaktivität gegen **IA-2-PTP** und **IA-2β** war das häufigste Muster. Auch restringierte **IA-2-PTP**-Reaktivität kam oft vor.

Restringierte Reaktivität gegen **IA-2β**, Autoantikörper gegen **IA-2β** und **IA-2-JM**, sowie gegen **IA-2-PTP** und **IA-2-JM** kamen in beiden Gruppen seltener vor (Abb.7).



**Abbildung 7** IA-2-Epitop-Verteilungsmuster bei Early und Late in der jeweils ersten IA-2A-positiven Serumprobe (im gesamten Beobachtungszeitraum)

Reaktivität gegen multiple IA-2-Epitope trat bei 18 Kindern (51,4%) der Early Gruppe und bei 7 Kindern (46,7%) der Late Gruppe auf ( $p = 1,0$ ). In der Early Gruppe wiesen alle 35 IA-2A-positiven Kinder multiple Autoantikörper gegen Inselantigene auf; in der Late Gruppe gab es 2 singularär IA-2A positive Kinder, welche beide Reaktivität gegen nur ein Epitop von IA-2 aufwiesen. Reaktivität gegen zwei oder drei IA-2-Konstrukte war in der Late Gruppe signifikant mit einem höheren IA-2A-Titer assoziiert als bei Reaktivität gegen kein oder gegen nur ein verwendetes IA-2-Konstrukt ( $p = 0,001$ ). In der Early Gruppe konnte keine signifikante Assoziation beobachtet werden ( $p = 0,08$ ) (Abb. 8).

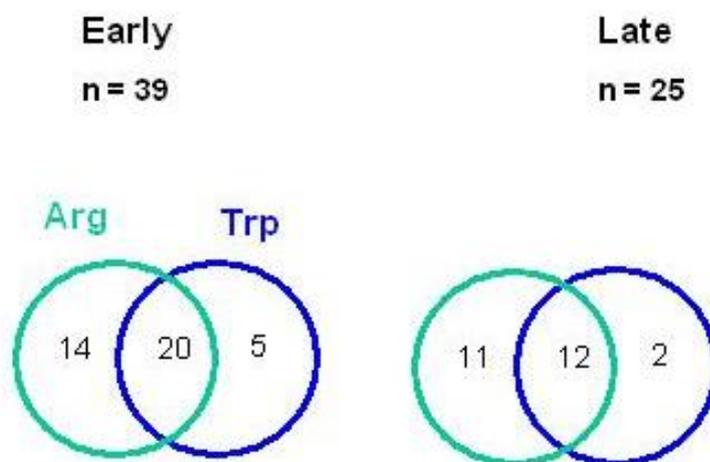


**Abbildung 8** Beziehung zwischen der IA-2-Epitop-Anzahl und dem IA-2A Titer bei Early und Late in der jeweils ersten IA-2A-positiven Serumprobe (im gesamten Beobachtungszeitraum)

## Epitope von ZnT8

Autoantikörper gegen die beiden Hauptvarianten des ZnT8-Moleküls aa 325-Arginin (R325) und aa 325-Tryptophan (W325) wurden in den Seren der insgesamt 39 ZnT8A-COOH positiven Personen der Early Gruppe und der 25 ZnT8A-COOH positiven Personen der Late Gruppe bei erstmaligem Auftreten von Reaktivität gegen ZnT8 bestimmt. Hierbei wurde der gesamte Beobachtungszeitraum berücksichtigt.

Beide Gruppen unterschieden sich nicht bezüglich der Prävalenz und Verteilung der Autoantikörper gegen die ZnT8-Epitope. Sowohl in der Early als auch in der Late Gruppe zeigte sich am häufigsten Reaktivität gegen beide Isoformen und gegen ZnT8-Arginin allein. Restringierte Reaktivität gegen ZnT8-Tryptophan wurde in beiden Gruppen am seltensten von den Autoantikörpern erkannt (Abb. 9).



**Abbildung 9** ZnT8-Epitop-Verteilungsmuster bei Early und Late in der jeweils ersten ZnT8A-positiven Serumprobe (im gesamten Beobachtungszeitraum)

### 5.2.2 Autoantikörper-Affinitäten

Autoantikörper-Affinitäten von IAA, GADA und IA-2A wurden in beiden Gruppen zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens des jeweiligen Autoantikörpers im gesamten Beobachtungszeitraum gemessen.

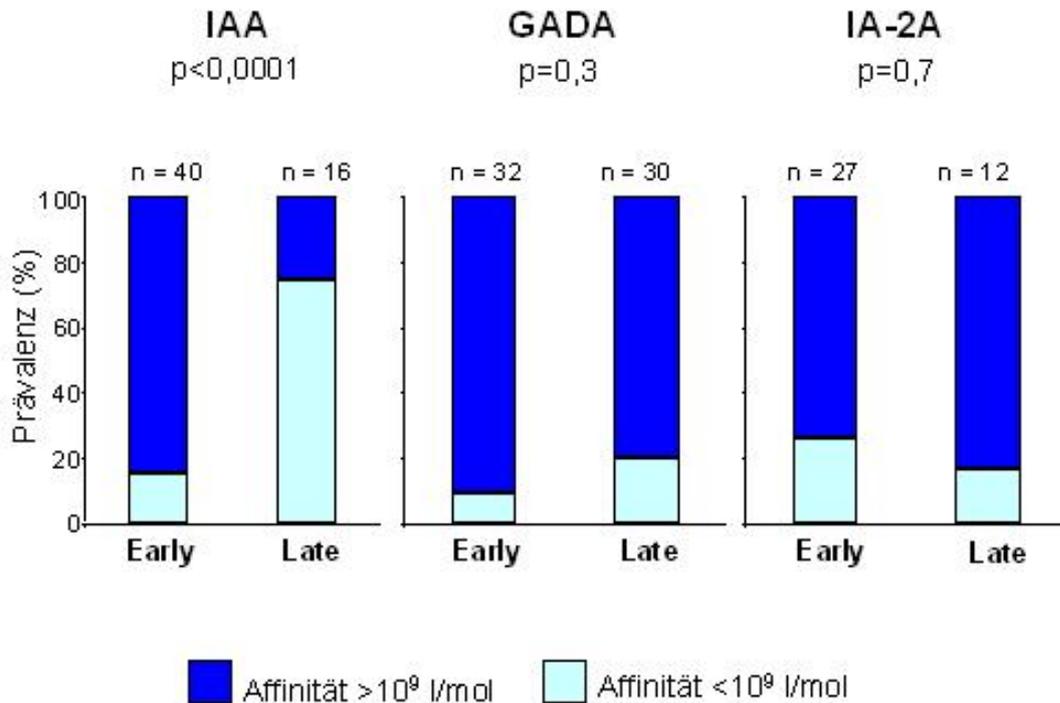
Dabei wurden  $\geq 10^9$  l/mol als hoch affin und  $< 10^9$  l/mol als niedrig affin definiert.

Serumproben zur Messung der IAA-Affinitäten waren von 40 der insgesamt (im gesamten Beobachtungszeitraum) 58 IAA-positiven Kinder der Early Gruppe und von 16 der insgesamt 48 IAA-positiven Kinder der Late Gruppe verfügbar. In der Early Gruppe kamen hohe Affinitäten signifikant häufiger vor als in der Late Gruppe ( $p < 0,0001$ ) (Abb.10).

Bei 32 der insgesamt 48 GADA-positiven Kindern der Early Gruppe und bei 30 der insgesamt 53 GADA-positiven Kindern der Late Gruppe wurden GADA-Affinitäten gemessen. Hier unterschieden sich die Affinitäten nicht signifikant (Abb.10).

IA-2A-Affinitäten wurden bei 27 von insgesamt 38 IA-2A-positiven Personen aus der Early Gruppe sowie bei 12 der insgesamt 16 IA-2A-positiven Personen der Late Gruppe bestimmt. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der IA-2-Affinität (Abb. 10).

Singulär Autoantikörper-positive Personen wiesen in der jeweils ersten Ak-positiven Probe sowohl niedrig affine, als auch hoch affine AAK auf (**EARLY:** 27% der singulär Ak positiven Kinder hatten niedrig affine IAA und 67% niedrig affine GADA; **LATE:** 100% der singulär Ak positiven Kinder hatten niedrig affine IAA und 35% niedrig affine GADA). Dagegen zeigten Kinder mit multiplen Autoantikörpern fast immer hoch affine-AAK (**EARLY:** 100% der multipel Ak positiven Kinder hatten hoch affine IAA, 96% hoch affine GADA, und 74% hoch affine IA-2A; **LATE:** 67% der multipel Ak positiven Kinder hatten hoch affine IAA, 100% hoch affine GADA, und 82% hoch affine IA-2A).



**Abbildung 10** Autoantikörper-Affinitäten der Early und Late Gruppe in der jeweils ersten Ak-positiven Serumprobe (im gesamten Beobachtungszeitraum)

### 5.3 Autoantikörper-Profile im Verlauf

Zur Analyse der schnellen Progression innerhalb eines kurzen Zeitraumes von ein bis zwei Jahren, standen Serumproben von 56 der 62 Kinder der Early Gruppe, sowie von 75 der insgesamt 80 Personen der Late Gruppe zur Verfügung.

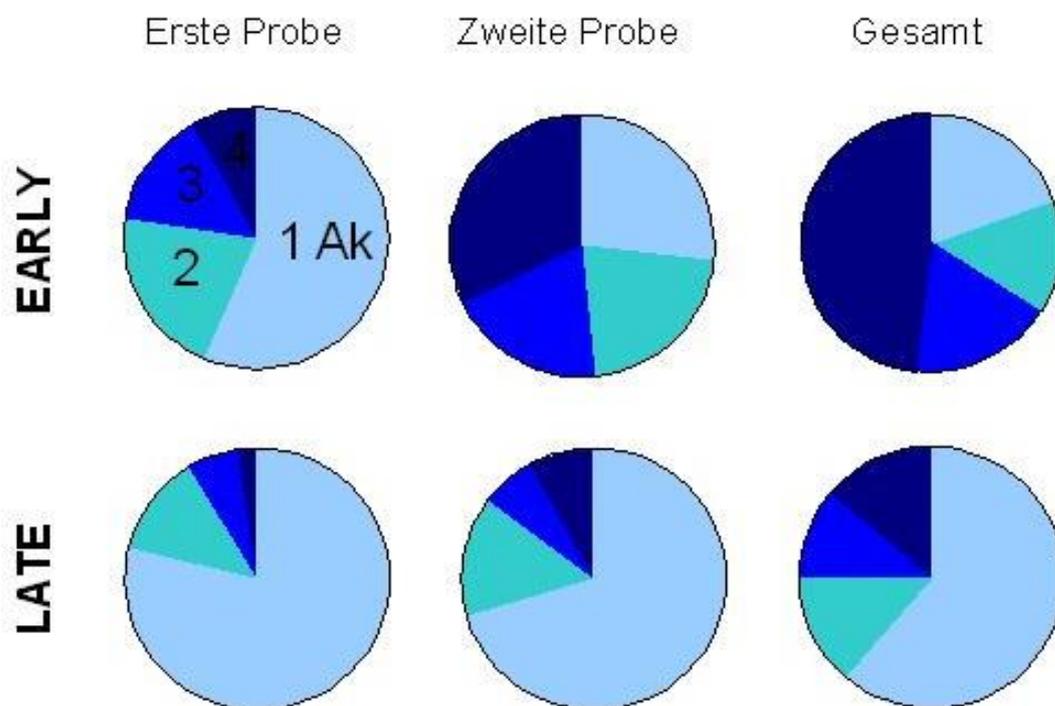
#### 5.3.1 Autoantikörperanzahl und -Prävalenz im Verlauf

Bei 33 Personen (58,9%) der Early Gruppe erhöhte sich die Anzahl positiver Autoantikörper vom Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von Autoimmunität (=Serokonversion) zur zweiten Probe (nach 1-2 Jahren Verlauf). Innerhalb der Late Gruppe weitete sich die Immunantwort bei 12 Personen (16%) auf weitere Zielantigene aus (p < 0,0001). In der Follow-up-Probe hatten bereits 41 Kinder (73,2%) der Early Gruppe multiple Antikörper. In der Late Gruppe gab es im Verlauf zur zweiten Probe 22 Kinder (29,3%) mit multiplen Antikörpern (p < 0,0001).

Bei Betrachtung der maximalen Autoantikörper-Anzahl während des gesamten Nachverfolgungszeitraumes, entwickelten 50 Kinder (80,6%) der Early Gruppe sowie 31 Kinder (38,8%) der Late Gruppe multiple Autoantikörper ( $p < 0,0001$ ).

Insgesamt 12 Personen (19,4%) der Early Gruppe und 49 Kinder (61,2%) der Late Gruppe zeigten im gesamten Nachverfolgungszeitraum singuläre Autoantikörper-Positivität (Abb. 11). Im Gesamtverlauf verloren 4 Kinder (6,5%) der Early Gruppe und 14 Kinder (17,5%) der Late Gruppe Autoantikörper-Reaktivität (transiente Autoantikörper).

In Abbildung 11 ist der Verlauf der Autoantikörper-Anzahl in beiden Gruppen vom Zeitpunkt der Serokonversion (= erstmaliges Auftreten von Insel-Autoimmunität) über den gesamten Nachverfolgungszeitraum veranschaulicht.



**Abbildung 11** Progression der Autoantikörper-Anzahl bei Early und Late beim erstmaligen Auftreten von Autoimmunität, 1-2 Jahre später und im Gesamtverlauf

Im Verlauf zur zweiten Serumprobe (1-2 Jahre nach Serokonversion) änderten sich die Prävalenzen von IAA und GADA in beiden Gruppen nicht wesentlich (vgl. Tab. 2 auf Seite 27) (Early: IAA 87% vs. 91%; GADA: 48% vs. 62%; Late: IAA: 49% vs. 51%; GADA: 59% vs. 63%). Somit waren sie weiterhin die am häufigsten vorkommenden Autoantikörper. Dagegen nahmen Autoantikörper gegen IA-2 und ZnT8 in beiden Gruppen zu.

Vor allem innerhalb der Early Gruppe erhöhte sich die Anzahl von Kindern mit IA-2A und ZnT8A signifikant von der ersten zur zweiten Probe (IA-2A: 16,1% vs. 48,2%,  $p=0,0003$ ; ZnT8A: 22,6% vs. 55,4%,  $p=0,0003$ ). Innerhalb der Late Gruppe kam kein Antikörper in der Follow-up-Probe signifikant häufiger vor als bei Serokonversion.

Die Prävalenzen der einzelnen Autoantikörper-Spezifitäten in der Follow-up-Probe innerhalb der Early und der Late Gruppe sind zusammenfassend in Tabelle 3 dargestellt. Es wird auch die Autoantikörper-Anzahl berücksichtigt.

**Tabelle 3** Prävalenzen der Autoantikörper in der Follow-up-Serumprobe (1-2 Jahre nach Serokonversion) innerhalb der Early und Late Gruppe

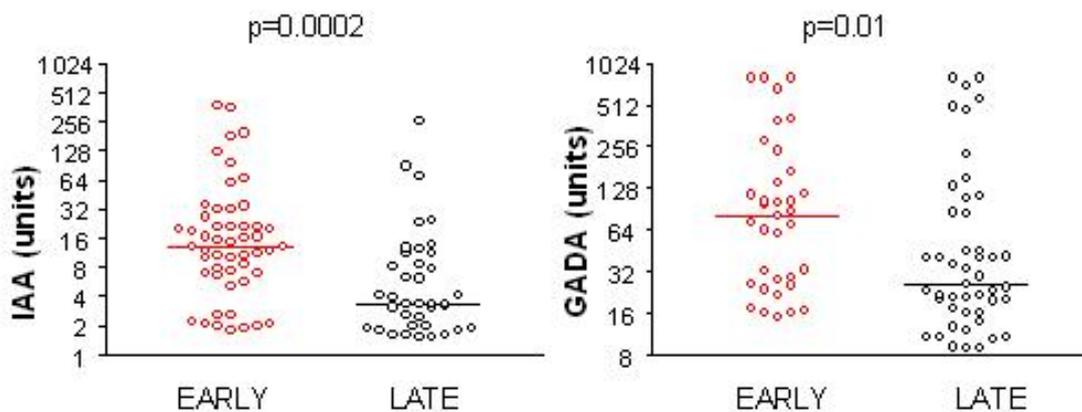
	<u>Gesamt</u>			<u>Singulär Ak pos.</u>			<u>Multiple Ak</u>		
	Early (n = 56)	Late (n = 75)		Early (n = 15)	Late (n = 53)		Early (n = 41)	Late (n = 22)	
<b>IAA</b>	51 (91,1%)	38 (50,7%)	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>	12 (80%)	23 (43,4%)	<b><math>p = 0,02</math></b>	39 (95,1%)	15 (68,2%)	<b><math>p=0,007</math></b>
<b>GADA</b>	35 (62,5%)	47 (62,7%)	$p = 1,0$	3 (20%)	27 (50,9%)	<b><math>p = 0,04</math></b>	32 (78%)	20 (90,9%)	$p = 0,3$
<b>IA-2A</b>	27 (48,2%)	10 (13,3%)	<b><math>p&lt;0,0001</math></b>	0	2 (3,8%)	$p = 0,1$	27 (65,9%)	8 (36,4%)	<b><math>p = 0,03</math></b>
<b>ZnT8A</b>	31 (55,4%)	19 (25,3%)	<b><math>p=0,0006</math></b>	0	1 (1,9%)	$p = 0,3$	31 (75,6%)	18 (81,8%)	$p = 0,8$

### 5.3.2 Autoantikörper-Titer im Verlauf

IAA-Titer erhöhten sich in der Early Gruppe im Verlauf von 1-2 Jahren nach der jeweils ersten IAA-positiven Probe signifikant ( $p = 0,02$ ); in der Late Gruppe gab es keine signifikante IAA-Titer-Veränderung ( $p = 0,3$ ). IAA-Titer in der Early Gruppe (Median der Titer: 13,1 units; IQR 6,9-26,7) waren auch in der zweiten Serumprobe signifikant höher als in der Late Gruppe (Median der Titer: 3,4 units; IQR 1,9-11,3) ( $p=0,0002$ ) (Abb.12) (vgl. Abb. 2 auf Seite 35).

Auch GADA-Titer stiegen innerhalb der Early Gruppe signifikant im Verlauf von der ersten zur zweiten Serumprobe an ( $p = 0,009$ ). Es gab keine signifikante Titerveränderung innerhalb der Late Gruppe ( $p=0,5$ ). Somit wurden GADA-Titer im Verlauf zur Follow-up-Probe in der Early Gruppe (Median der Titer: 80 units; IQR 26-170,2) signifikant höher als innerhalb der Late Gruppe (Median der Titer: 26,2 units; IQR 16,2-86,2) ( $p=0,01$ ) (Abb.12) (vgl. Abb.2 auf Seite 35).

IA-2A und ZnT8A-Titer blieben in beiden Gruppen ähnlich (IA-2A:  $p=0,6$ ; ZnT8A-Arginin:  $p=0,8$ ; ZnT8A-Tryptophan:  $p=0,3$ ).



**Abbildung 12** IAA- und GADA-Titer in der Follow-up-Probe (1-2 Jahre nach dem jeweils erstmaligen Auftreten von IAA oder GADA) innerhalb der Early und Late Gruppe

## 5.4 Antigen-spezifisches Muster im Verlauf

### 5.4.1 Epitop-Spezifitäten von GADA, IA-2A und ZnT8A im Verlauf

#### Epitope von GAD 65

Von 34 der insgesamt (im gesamten Nachverfolgungszeitraum) 48 GADA positiven Kinder der Early Gruppe, und von 45 der insgesamt 53 GADA positiven Kinder der Late Gruppe standen Follow-up-Serumproben (1-2 Jahre nach dem jeweils) erstmaligen Auftreten von GADA) zur Bestimmung der drei oben genannten GAD-Epitope zur Verfügung.

Serumproben für die Epitopbestimmung zu beiden Zeitpunkten (beim jeweils erstmaligen Auftreten von GADA sowie ein bis zwei Jahre später) waren von 24 der 34 Kinder der Early Gruppe und von 40 der 45 Kinder der Late Gruppe verfügbar. Innerhalb der Early Gruppe weitete sich bei 10 Kindern (41,7%) die Immunantwort auf zusätzliche GAD-Epitope aus (intramolekulares Spreading), und in der Late Gruppe bei 8 Kindern (20%) ( $p = 0,09$ ). Reaktivität gegen multiple Epitope nahm dadurch vor allem innerhalb der Early Gruppe zu (1. Probe: 43%; 2. Probe: 64,7%), und konnte in der Follow-up-Probe dort signifikant häufiger beobachtet werden als in der Late Gruppe (1. Probe: 27%; 2. Probe: 35,6%) ( $p = 0,01$ ). Verlust von Reaktivität gegen GAD-Epitope wurde in beiden Gruppen selten beobachtet.

Prävalenzen der Autoantikörper gegen die drei Epitope von GAD 65 änderten sich von der ersten zur Follow-up-Probe wie folgt (Tab.4) (vgl. Abb. 3 auf Seite 36): Kinder beider Gruppen entwickelten im Verlauf AAK gegen GAD-MID dazu, so dass diese AAK weiterhin am häufigsten beobachtet wurden (Early: 57% vs. 73%; Late: 49% vs. 56%). Ein bis zwei Jahre nach dem erstmaligen Auftreten von GADA nahmen vor allem bei Kindern der Early Gruppe Autoantikörper gegen GAD-COOH zu (1. Probe: 43%; 2. Probe: 68%); dagegen änderte sich die Prävalenz von AAK gegen GAD-COOH innerhalb der Late Gruppe kaum (1. Probe: 31%; 2. Probe: 36%). Autoantikörper gegen GAD-NH<sub>2</sub> blieben innerhalb der Early Gruppe sehr konstant (1. Probe: 17%; 2. Probe: 21%). Ein Zuwachs von GAD-NH<sub>2</sub> Autoantikörpern von 18% auf 27% konnte für Kinder der Late Gruppe beobachtet werden. Im Verlauf zur Follow-up-Probe zeigten beide Gruppen seltener Autoantikörper-Negativität gegen die verwendeten GAD-Konstrukte (Early: 37% vs. 21%; Late: 31% vs. 27%).

In Tabelle 4 sind die Autoantikörper-Prävalenzen gegen Epitope von GAD 65 in der Follow-up-Probe zusammenfassend dargestellt.

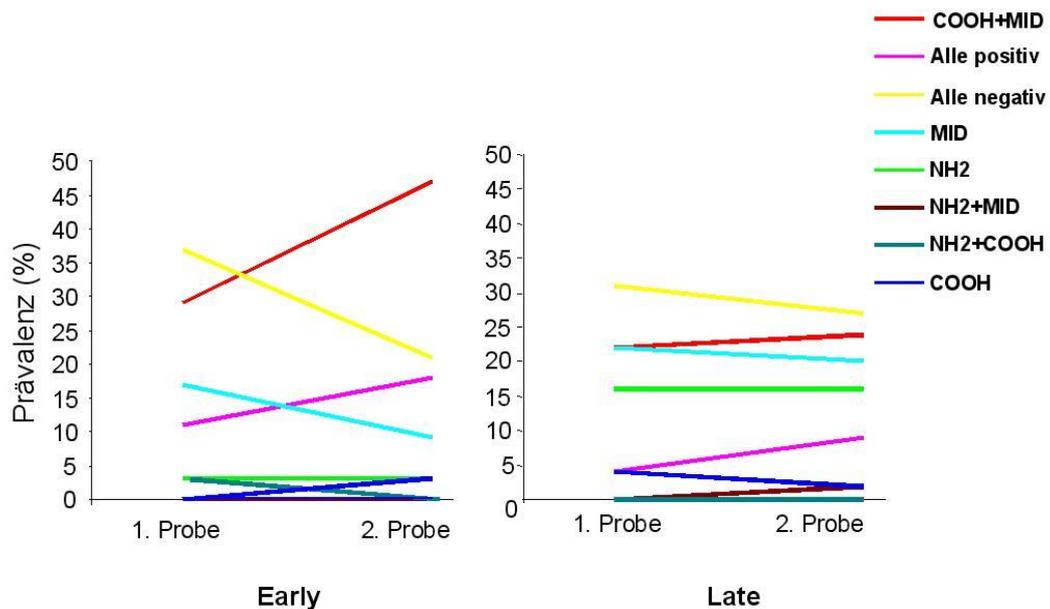
**Tabelle 4** Autoantikörper gegen GAD-spezifische Epitope in der Follow-up-Probe (1-2 Jahre nach dem jeweils erstmaligen Auftreten von GADA) in der Early und Late Gruppe; Einige Proben zeigten keine Reaktivität gegen die verwendeten Konstrukte trotz GADA-Positivität

Autoantikörper gegen Epitope von GAD 65	Early (n = 34)	Late (n= 45)	
COOH	23 (67,6%)	16 (35,6%)	p = 0,007
MID	25 (73,5%)	25 (55,6%)	p = 0,2
NH <sub>2</sub>	7 (20,6%)	12 (26,7%)	p = 0,6
neg. für alle	7 (20,6%)	12 (26,7%)	p = 0,6

Obwohl Reaktivität gegen multiple Epitope in der Follow-up-Probe signifikant häufiger in der Early Gruppe vorkam, zeigten beide Gruppen am häufigsten folgende Epitopverteilungsmuster (Abb. 13) (vgl. Abb. 4 auf Seite 37): Die Entwicklung zusätzlicher GAD-MID- und GAD-COOH-AAk führte in beiden Gruppen zu einem Anstieg der Reaktivität gegen **GAD-COOH und GAD-MID** und gegen **alle drei Epitope** (Abb. 13).

Dagegen zeigte sich restringierte Reaktivität gegen **GAD-MID** in beiden Gruppen seltener als in der ersten Probe (Abb. 13).

Restringierte Reaktivität gegenüber **GAD-NH<sub>2</sub>** blieb in beiden Gruppen konstant, und war auch in der Follow-up-Probe ein seltenes Muster (Abb.13). Es war weiterhin ausschließlich mit singulärer GADA-Reaktivität assoziiert.



**Abbildung 13** Verlauf und Prävalenzen der GAD-Epitop-Verteilungsmuster von der jeweils ersten GADA-positiven Serumprobe zur Follow-up-Probe (1-2 Jahre später) innerhalb der Early und Late Gruppe; (Legende rechts oben für Early und Late)

Wie bereits in der jeweils ersten GADA-positiven Serumprobe, war Reaktivität gegen mehrere GAD-Epitope auch in der Follow-up-Probe in beiden Gruppen signifikant mit einem höheren GADA-Titer assoziiert (Early Gruppe:  $p < 0,0001$ ; Late Gruppe:  $p < 0,0001$ ).

### Epitope von IA-2

Von 26 der insgesamt (im gesamten Nachverfolgungszeitraum) 38 IA-2A positiven Kinder der Early Gruppe und von 11 der 16 IA-2A positiven Kinder der Late Gruppe standen Follow-up-Serumproben (1-2 Jahre nach dem jeweils erstmaligen Auftreten von IA-2A) zur Bestimmung der drei oben genannten IA-2-Epitope zur Verfügung.

Bei 24 Kindern der Early Gruppe und bei 11 Kindern der Late Gruppe waren Proben für die Epitopbestimmung zu beiden untersuchten Zeitpunkten (beim jeweils erstmaligen Auftreten von IA-2A sowie ein bis zwei Jahre später) verfügbar.

Intramolekulares Spreading wurde bei 14 Kindern (58,3%) der Early Gruppe sowie bei 5 Kindern (45,5%) der Late Gruppe beobachtet ( $p = 0,7$ ). Reaktivität gegen multiple Epitope konnte somit in der Follow-up-Probe in beiden Gruppen häufiger als in der ersten Probe beobachtet werden (Early: 51% vs. 77%; Late: 47% vs. 64%). Verlust von Reaktivität gegen IA-2-Epitope kam nur ein einziges Mal vor.

Folgende Veränderungen bezüglich der Prävalenz von AAK gegen IA-2-Epitope konnten im Verlauf (1-2 Jahre nach dem jeweils erstmaligen Auftreten von IA-2A) beobachtet werden (Tab. 5) (vgl. Abb. 6 auf Seite 39): Kinder beider Gruppen entwickelten im Verlauf vor allem AAK gegen IA-2-PTP (Early: 57% vs. 92%; Late: 67% vs. 72%) und IA-2 $\beta$  (Early: 57% vs. 77%; Late: 60% vs. 64%) dazu, so dass diese AAK weiterhin am häufigsten beobachtet wurden. Autoantikörper gegen IA-2-JM kamen weiterhin seltener vor. Im Verlauf zur Follow-up-Probe zeigten beide Gruppen seltener Autoantikörper-Negativität gegen die verwendeten IA-2-Konstrukte (Early: 14% vs. 0%; Late: 13% vs. 9%).

In Tabelle 5 sind die Autoantikörper-Prävalenzen gegen Epitope von IA-2 in der Follow-up-Probe zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 5** Autoantikörper gegen IA-2-spezifische Epitope in der Follow-up-Probe (1-2 Jahre nach dem jeweils erstmaligen Auftreten von GADA) in der Early und Late Gruppe; Eine Probe zeigte keine Reaktivität gegen die verwendeten Konstrukte trotz IA-2A-Positivität

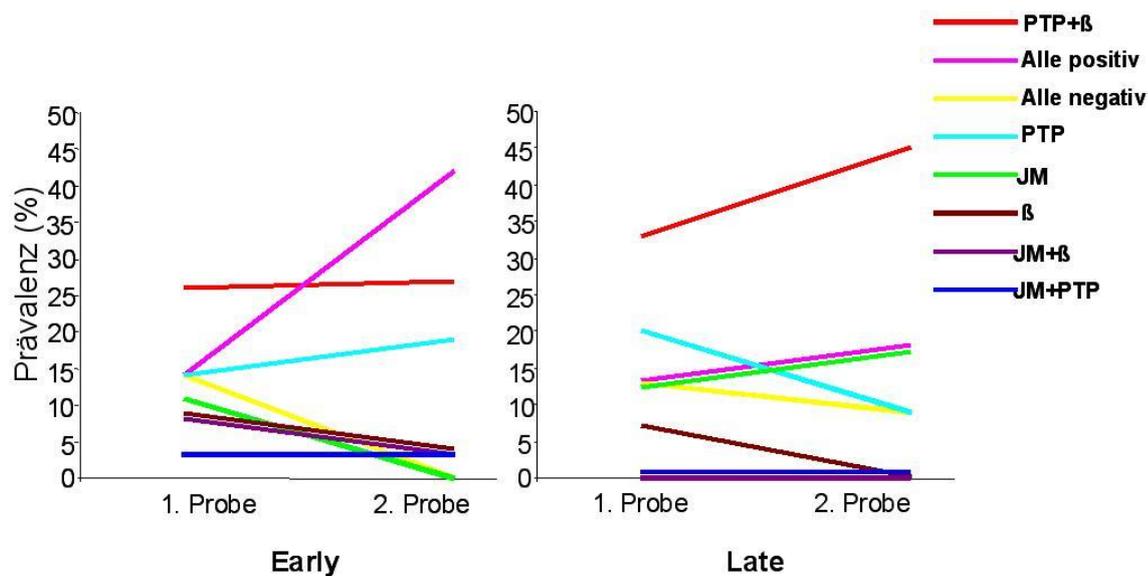
Autoantikörper gegen Epitope von IA-2	Early (n = 26)	Late (n= 11)	
<b>PTP</b>	24 (92,3%)	8 (72,7%)	p = 0,1
<b>IA-2<math>\beta</math></b>	20 (76,9%)	7 (63,6%)	p = 0,2
<b>JM</b>	13 (50%)	4 (36,7%)	p = 0,5
<b>neg. für alle</b>	0	1 (9%)	p = 0,3

Durch die Entwicklung zusätzlicher AAK gegen IA-2-Epitope im Verlauf zur zweiten Probe, war Reaktivität gegen **IA-2-PTP und IA-2 $\beta$**  weiterhin in beiden Gruppen ein sehr häufiges Epitop-Verteilungsmuster (Abb. 14). Vor allem innerhalb der Early Gruppe konnte ein starker Anstieg von Reaktivität gegen **alle drei IA-2-Epitope** beobachtet werden.

Auch Kinder der Late Gruppe wiesen diese Konstellation häufiger auf als in der ersten Probe (Abb. 14) (vgl. Abb. 7 auf Seite 40). Restringierte Reaktivität gegen ein Epitop wurde in beiden Gruppen seltener beobachtet als Reaktivität gegen multiple Epitope (Abb. 14).

Seltene IA-2-Epitop-Verteilungsmuster in der ersten Probe blieben auch in der Follow-up-Probe selten (vgl. Abb. 7 auf Seite 40).

In der Follow-up-Probe gab es nur noch einziges singularär IA-2A positives Kind der Late Gruppe, welches restringierte Reaktivität gegen IA-2-JM aufwies.



**Abbildung 14** Verlauf und Prävalenzen der IA-2-Epitop-Verteilungsmuster von der jeweils ersten IA-2A-positiven Serumprobe zur Follow-up-Probe (1-2 Jahre später) innerhalb der Early und Late Gruppe; (Legende rechts oben für Early und Late)

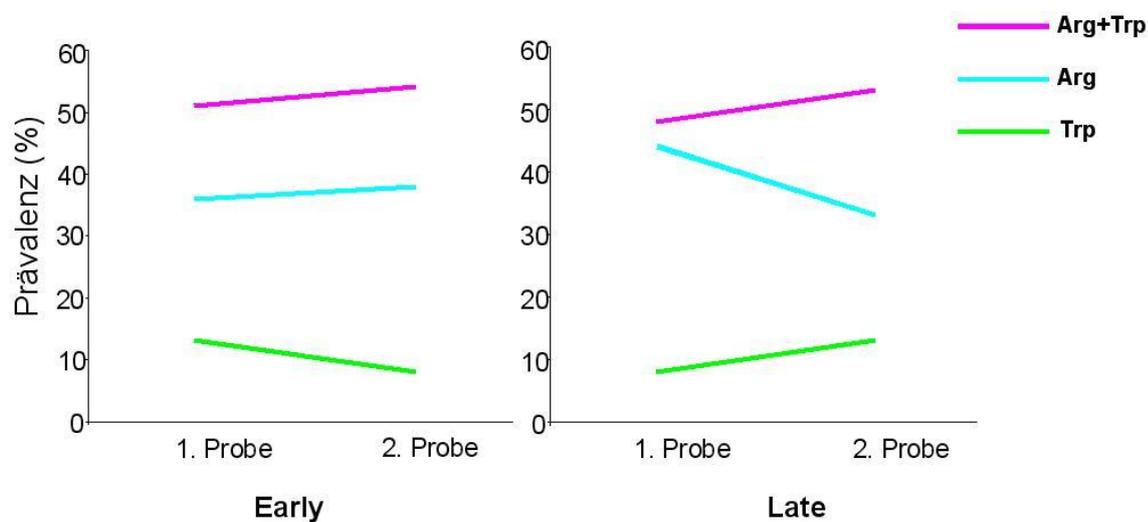
Reaktivität gegen mehrere IA-2-Epitope war in der Follow-up-Probe in beiden Gruppen signifikant mit einem höheren IA-2A-Titer assoziiert (Early Gruppe:  $p = 0,02$ ; Late Gruppe:  $p = 0,02$ ).

### Epitope von ZnT8

Von 26 der insgesamt (im gesamten Nachverfolgungszeitraum) 39 ZnT8A positiven Kinder der Early Gruppe und von 15 der 25 ZnT8A positiven Kindern der Late Gruppe standen Follow-up-Serumproben (1-2 Jahre nach dem jeweils erstmaligen Auftreten von ZnT8A) zur Bestimmung der zwei oben genannten ZnT8-Hauptvarianten zur Verfügung.

In beiden Gruppen gab es bei jeweils etwa 20% der Proben intramolekulares Spreading. Verlust von Reaktivität gegen eine der beiden Hauptvarianten trat innerhalb der zwei Gruppen jedoch auch bei jeweils ungefähr 20% der Proben auf (Abb. 15). Somit gab es im kurzfristigen Verlauf keine signifikanten Veränderungen bezüglich der AAK Prävalenzen gegen ZnT8 Epitope und auch keine Veränderungen im Epitop-Verteilungsmuster (vgl. Abb. 9 auf Seite 41).

Nur ein Kind der Late Gruppe war singularär ZnT8-Autoantikörper positiv und wies Antikörper gegen beide Epitope auf. Alle anderen ZnT8A positiven Kinder in beiden Gruppen hatten multiple Autoantikörper.



**Abbildung 15** Verlauf und Prävalenzen der ZnT8-Epitop-Verteilungsmuster von der jeweils ersten ZnT8A-positiven Serumprobe zur Follow-up-Probe (1-2 Jahre später) innerhalb der Early und Late Gruppe; (Legende rechts oben für Early und Late); Arg = ZnT8A-Arginin, Trp = ZnT8A-Tryptophan

#### 5.4.2 Autoantikörper-Affinitäten im Verlauf

Von insgesamt (im gesamten Nachverfolgungszeitraum) 58 IAA-positiven Kindern der Early Gruppe waren 23 Verlaufspuren (= Serumproben 1-2 Jahre nach dem jeweils erstmaligen Auftreten von IAA) zur Bestimmung der IAA-Affinität vorhanden. Von den insgesamt 48 IAA-positiven Kindern der Late Gruppe standen 8 Verlaufspuren zur Verfügung. IAA-Affinitäten wurden hierbei auch bei jenen Kindern im Verlauf bestimmt, von denen beim erstmaligen Auftreten von IAA keine Serumprobe zur Affinitätsmessung zur Verfügung stand. Personen der Late Gruppe wiesen in der Verlaufs-Probe seltener hoch affine IAA auf als in der ersten IAA-positiven Serumprobe (25% vs. 13%).

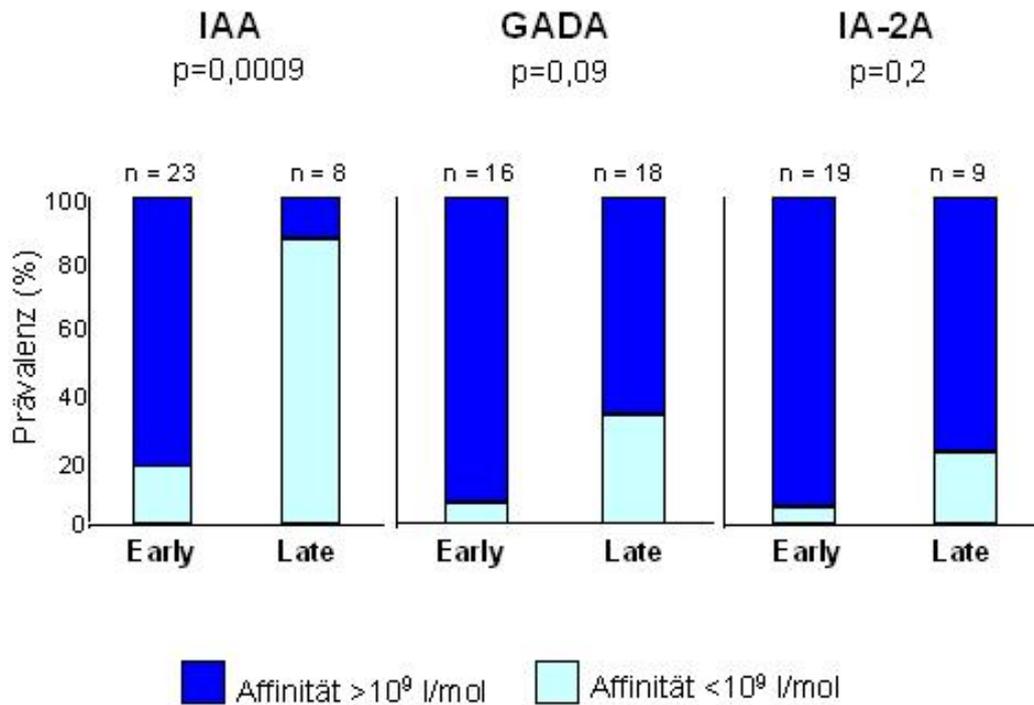
Innerhalb der Early Gruppe blieben dagegen die Affinitäten konstant. Hoch affine IAA waren somit in der Follow-up-Probe, wie bereits in der ersten IAA-positiven Probe, in der Early Gruppe signifikant häufiger als in der Late Gruppe ( $p = 0,0009$ ) (Abb.16) (vgl. Abb. 10 auf Seite 43).

Verlaufsproben zur Bestimmung der GADA-Affinität waren von 16 der insgesamt (im gesamten Nachverfolgungszeitraum) 48 GADA-positiven Kinder der Early Gruppe und von 18 der 53 GADA-positiven Kinder der Late Gruppe verfügbar.

GADA-Affinitäten wurden hierbei auch bei jenen Kindern im Verlauf bestimmt, von denen beim erstmaligen Auftreten von GADA keine Serumprobe zur Affinitätsmessung zur Verfügung stand. Innerhalb der Early Gruppe blieb die Prävalenz hoch affiner GADA konstant. Bei Kindern der Late Gruppe zeigten sich hoch affine GADA mit einer Prävalenz von etwa 70% etwas seltener als in der ersten GADA-positiven Probe (80%); dennoch unterschieden sich die GADA-Affinitäten auch in der Follow-up-Probe nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,09$ ) (Abb.16) (vgl. Abb. 10 auf Seite 43).

In der Follow-up-Probe konnten IA-2A-Affinitäten bei 19 der insgesamt 38 IA-2A-positiven Personen der Early Gruppe sowie bei 9 der 16 IA-2A-positiven Personen der Late Gruppe bestimmt werden. Auch hier wurden IA-2A-Affinitäten ebenfalls bei jenen Kindern im Verlauf bestimmt, von denen beim erstmaligen Auftreten von GADA keine Serumprobe zur Affinitätsmessung zur Verfügung stand. Vor allem Kinder der Early Gruppe zeigten in der Follow-up-Probe häufiger hoch affine IA-2-Autoantikörper als beim erstmaligen Auftreten von IA-2A (95% vs. 74%). Die Prävalenz hoch affiner IA-2A blieb innerhalb der Late Gruppe relativ konstant (83% vs. 78%). Beide Gruppen zeigten weiterhin ähnliche Häufigkeiten bezüglich der IA-2A-Affinitäten ( $p = 0,2$ ) (Abb. 16) (vgl. Abb. 10 auf Seite 43).

Singulär Autoantikörper-positive Personen wiesen in der Follow-up-Probe häufig niedrig affine AAK auf (**EARLY:** 60% der singulär Ak positiven Kinder hatten niedrig affine IAA, und 50% niedrig affine GADA; **LATE:** 100% der singulär Ak positiven Kinder hatten niedrig affine IAA, und 60% niedrig affine GADA). Kinder mit multiplen Autoantikörpern zeigten, wie bereits in der jeweils ersten Ak-positiven Probe fast immer hoch affine-AAK (**EARLY:** 94% der multipel Ak positiven Kinder hatten hoch affine IAA, 100% hoch affine GADA, und 94% hoch affine IA-2A; **LATE:** 50% der multipel Ak positiven Kinder hatten hoch affine IAA, 100% hoch affine GADA, und 88% hoch affine IA-2A).



**Abbildung 16** Vergleichende Darstellung der Autoantikörper-Affinitäten zwischen der Early und Late Gruppe in der Follow-up-Probe (1-2 Jahre nach dem erstmaligen Auftreten des jeweiligen Ak)

### 5.5 Genotyp und Einfluss auf den Ak-Status

#### HLA-Klasse-II-Genotyp

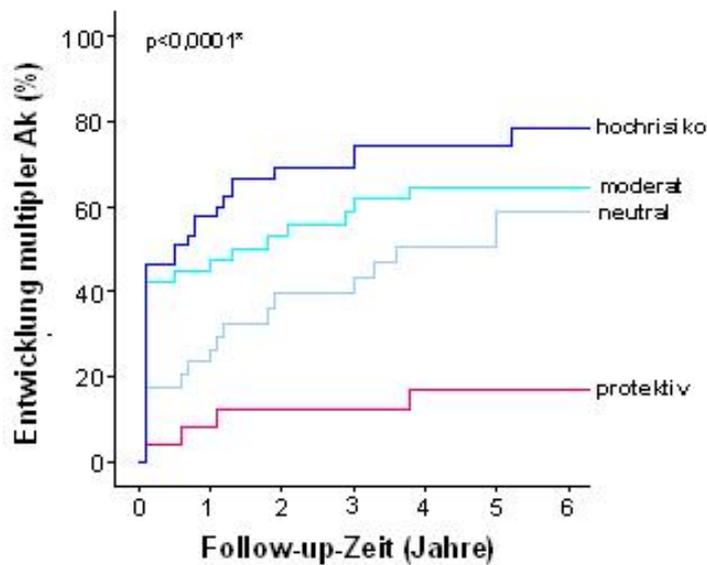
Bei 61 Kindern der Early Gruppe und bei 80 Kindern der Late Gruppe wurde der HLA-Klasse-II Genotyp bestimmt. In beiden Gruppen zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen der Progression zu multiplen Autoantikörpern und dem Vorhandensein bestimmter HLA-Klasse-II Genotypen. Dagegen kamen protektive HLA-Klasse-II-Allele in beiden Gruppen signifikant häufiger bei Kindern vor, die keine Progression zu multiplen Autoantikörpern aufwiesen.

Tabelle 7 zeigt die Prävalenzen der verschiedenen Genotypen für beide Gruppen. Kinder der Early Gruppe wiesen signifikant häufiger einen Hochrisiko-Genotyp auf als Kinder der Late Gruppe ( $p = 0,02$ ). Protektive HLA-Klasse-II Allele kamen häufiger in der Late Gruppe vor, jedoch nicht signifikant häufiger als in der Early Gruppe ( $p = 0,07$ ).

**Tabelle 6** Prävalenzen der HLA-Klasse-II-Genotypen in der Early und Late Gruppe; protektive Allele: HLA DQB1\*0602, HLA DQB1\*0603, HLA DQB1\*0503, HLA DQB1\*0301, HLA DQB1\*0303; moderater Genotyp: HLA DRB1\*04/08; DQB1\*0302/0402, HLA DRB1\*04/13; DQB1\*0302/0604, HLA DRB1\*04/16; DQB1\*0302/0502, HLA DRB1\*04/01; DQB1\*0302/0501; Hochrisiko-Genotyp: HLA DRB1\*03/04; DQB1\*02/0302, HLA DRB1\*04/04; DQB1\*0302/0302; neutral: alle nicht Genannten

HLA-Klasse-II	Early (n = 61)	Late (n = 80)	
<b>protektiv</b>	6 (9,9%)	18 (22,5%)	p = 0,07
<b>neutral</b>	11 (18%)	23 (28,8%)	p = 0,2
<b>moderat</b>	18 (29,5%)	20 (25%)	p = 0,6
<b>hochrisiko</b>	26 (42,6%)	19 (23,7%)	<b>p = 0,02</b>

Betrachtete man jedoch in beiden Gruppen nur diejenigen Personen, die multiple Antikörper entwickelt hatten, zeigte sich in den zwei Gruppen eine ähnliche Verteilung der verschiedenen Genotypen. Daher wurden beide Gruppen in der Lifetable-Analyse zusammengefasst betrachtet (Abb. 17): Kinder mit protektiven HLA-Klasse-II-Allelen hatten gegenüber allen anderen Genotypen mit 16,9% (CI 3,6-30,2) ein signifikant geringeres Risiko innerhalb von 6 Jahren multiple Antikörper zu entwickeln ( $p < 0,0001$  für moderat und hochrisiko,  $p = 0,01$  für neutral). Das kumulative Risiko innerhalb von 6 Jahren multiple Antikörper zu entwickeln betrug bei Personen mit einem Hochrisiko-HLA-Klasse-II-Genotyp 78,6% (CI 65,3-91,9) und war gegenüber Personen mit einem neutralen Genotyp, die ein kumulatives Risiko von 58,9% (CI 39,3-78,5) aufwiesen erhöht ( $p = 0,003$ ). Auch Kinder mit moderatem Genotyp hatten ein hohes kumulatives Risiko von 64,7% (CI 49,2-80,2); das Risiko war jedoch gegenüber Personen mit neutralem Genotyp nicht signifikant erhöht ( $p = 0,07$ ).



Protektiv	24	21	19	11
Neutral	34	17	12	5
Moderat	38	16	12	7
Hochrisiko	45	12	10	4

**Abbildung 17** Life Table Analyse: Kumulatives Risiko für die Entwicklung multipler Autoantikörper innerhalb von 6 Jahren bei Kindern, die einen protektiven, einen neutralen, einen moderaten, oder einen hochrisiko- HLA-DR/DQ-Genotyp aufwiesen; beide Gruppen (Early+Late) sind in der Analyse zusammengefasst; \*p-Wert für protektiver Genotyp gegenüber den anderen Genotypen

### INS VNTR Genotyp

Bei insgesamt 135 Kindern beider Gruppen (IAA positive und IAA negative Personen) erfolgte die INS VNTR Genotypisierung.

Es gab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der INS VNTR Genotyp-Prävalenzen zwischen der Early und der Late Gruppe (Tabelle 7).

**Tabelle 7** Prävalenzen der INS VNTR-Genotypen in der Early und Late Gruppe

INS VNTR Genotyp	Early (n = 58)	Late (n = 77)
I/I INS VNTR	38 (65,5%)	53 (68,8%)
I/III und III/III INS VNTR	20 (34,5%)	24 (31,2%)

p = 0,7

In der Life Table Analyse, in der beide Gruppen zusammen betrachtet wurden, hatten Kinder mit einem I/I INS VNTR Genotyp ein ähnliches kumulatives Risiko innerhalb von 6 Jahren multiple Antikörper zu entwickeln wie Kinder mit einem I/III oder III/III INS VNTR Genotyp (kumulatives Risiko: 57% (CI 46,2-67,8) vs. 62,1% (CI 46,4-77,6); p = 0,5)

### Zink Transporter 8 (SLC30A8) Genotyp

Der SLC30A8 SNP rs 13266634 Genotyp wurde sowohl bei ZnT8A positiven als auch bei ZnT8A negativen Kindern beider Gruppen bestimmt (insgesamt bei 119 Kindern).

Es gab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der SLC30A8-Genotyp-Prävalenzen zwischen der Early und der Late Gruppe (Tabelle 8).

**Tabelle 8** Prävalenzen des SLC30A8 (SNP) rs 13266634-Genotyps in der Early und Late Gruppe;  
 CC = homozygoter Genotyp für das R325-kodierende C-Allel,  
 TT = homozygoter Genotyp für das W325-kodierende C-Allel,  
 CT = heterozygoter Genotyp

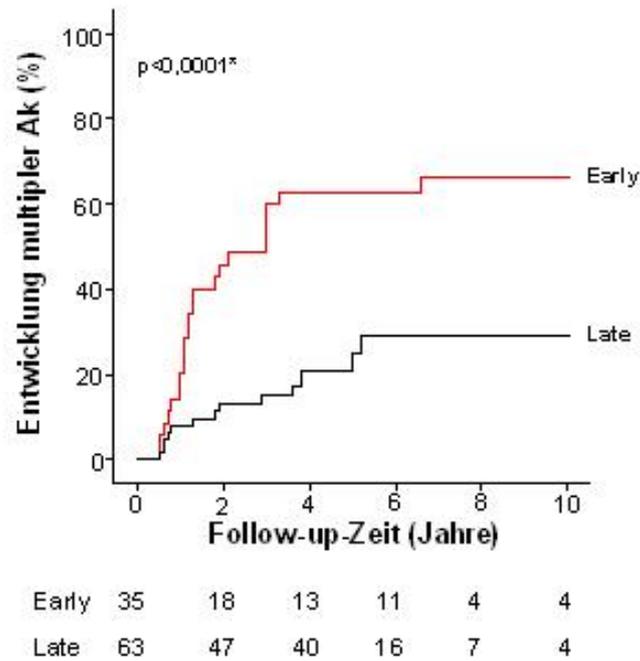
SLC30A8- (SNP) rs 13266634 Genotyp	Early (n = 56)	Late (n = 63)	
CC/TT	32 (57,1%)	41 (65,1%)	p = 0,5
CT	24 (42,9%)	22 (34,9%)	

In der Life Table Analyse, in der beide Gruppen zusammen betrachtet wurden, wiesen Kinder mit einem homozygoten SLC30A8 Genotyp ein ähnliches kumulatives Risiko auf, innerhalb von 6 Jahren multiple Antikörper zu entwickeln, wie Kinder mit einem heterozygoten SLC30A8 Genotyp (kumulatives Risiko: 57,9% (CI 46,5-69,3) vs. 63,2% (CI 48,3-78,1); p = 0,9).

### **5.6 Progression zu multiplen Antikörpern und zum T1DM**

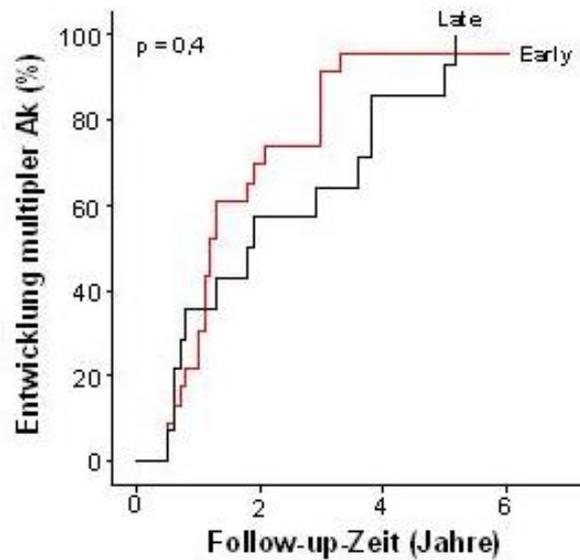
Von den insgesamt 62 Kindern der Early Gruppe hatten im Gesamtverlauf 50 Personen (80,6%) multiple Antikörper entwickelt (Kinder mit multiplen AAK bei Serokonversion und mit Entwicklung multipler AAK im Verlauf). Von den 80 Kindern der Late Gruppen waren es nur 31 Personen (38,8%) (p<0,0001).

Betrachtete man nur die 35 Kinder der Early Gruppe und die 63 Kindern der Late Gruppe, die bei Serokonversion nur einen Autoantikörper aufwiesen, zeigten auch hier Personen der Early Gruppe ein signifikant höheres Risiko eine Progression zu multiplen Antikörpern durchzumachen als Kinder der Late Gruppe (Abb. 18). So betrug das kumulative Risiko für Kinder der Early Gruppe innerhalb von 10 Jahren multiple Antikörper zu entwickeln 66,2% (CI 50,3-82,1) und für Kinder der Late Gruppe 29,2% (CI 14,7-43,7) (p<0,0001).



**Abbildung 18** Life Table Analyse: Kumulatives Risiko für die Entwicklung multipler Autoantikörper innerhalb von 10 Jahren bei Kindern der Early Gruppe (rote Kurve) und bei Kindern der Late Gruppe (schwarze Kurve), die nur einen AAK bei Serokonversion (= erstmaliges Auftreten von Insel-Autoimmunität) aufwiesen

Die 23 Kinder der Early Gruppe sowie die 14 Kinder der Late Gruppe, die eine Progression zu multiplen Antikörpern durchgemacht hatten, zeigten jedoch keinen Unterschied bezüglich der Schnelligkeit dieser Progression ( $p = 0,4$ ) (Abb. 19).

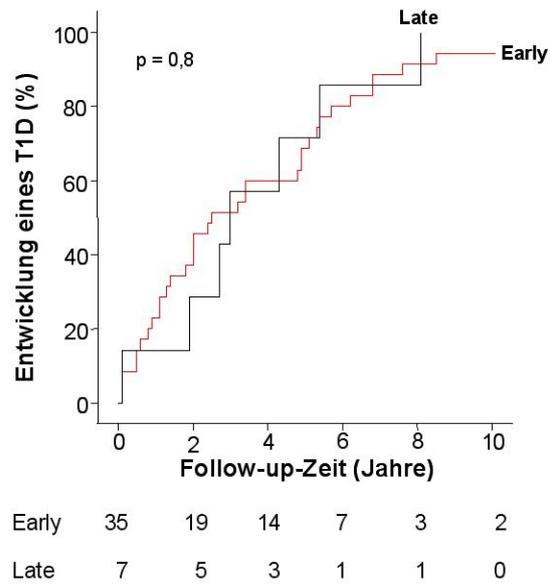


Early	23	7	1	1
Late	14	6	2	1

**Abbildung 19** Life Table Analyse: Progression zu multiplen Autoantikörpern innerhalb von 6 Jahren, bei Kindern der Early Gruppe (rote Kurve) und bei Kindern der Late Gruppe (schwarze Kurve), die nur einen AAK bei Serokonversion (= erstmaliges Auftreten von Insel-Autoimmunität) aufwiesen

Von den 62 Kindern der Early Gruppe entwickelten 36 Personen (58,1%) im Verlauf einen T1DM. In der Late Gruppe entwickelten 8 von 80 Kindern (10%) einen T1DM ( $p < 0,0001$ ). 35 Kinder der Early Gruppe hatten vor Diabetesmanifestation multiple Antikörper entwickelt. Sieben Kinder der Late Gruppe wiesen bei Diabetesmanifestation Reaktivität gegen multiple Antikörper auf. In beiden Gruppen gab es jeweils nur ein singular Autoantikörper-positives Kind mit T1DM. Diese Kinder hatten beide hoch affine GAD-Antikörper auf und waren Träger des HLA DR3 Allels.

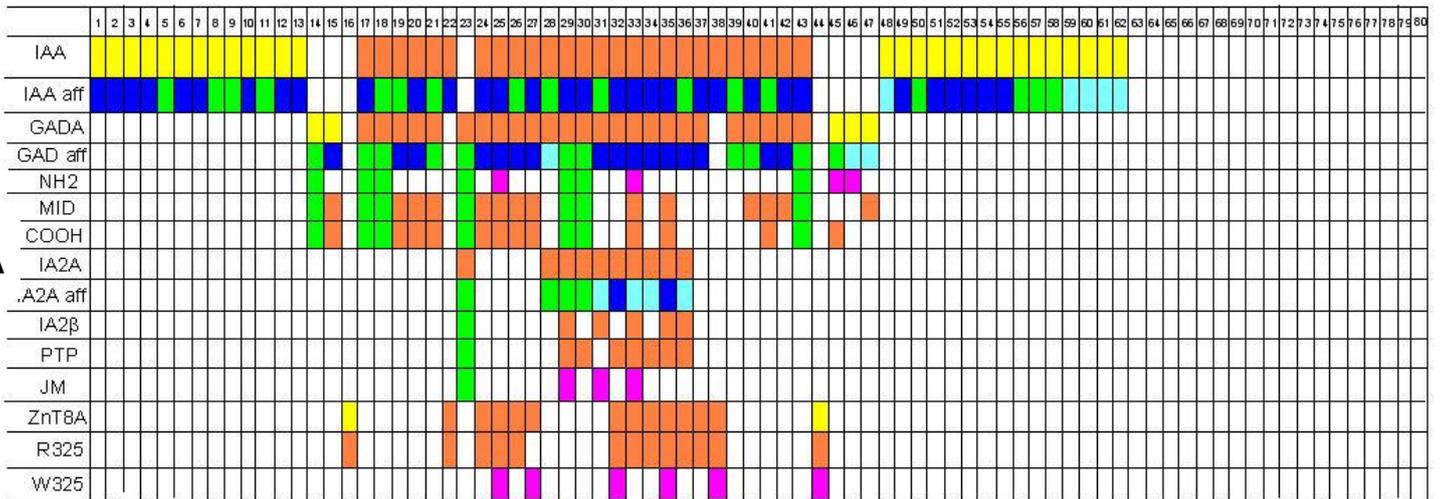
Die 35 Kinder der Early Gruppe und die 7 Kinder der Late Gruppe mit multiplen Antikörpern, die eine Progression zum T1DM machten, zeigten keinen Unterschied in Bezug auf die Schnelligkeit dieser Progression ( $p = 0,8$ ) (Abb. 20):



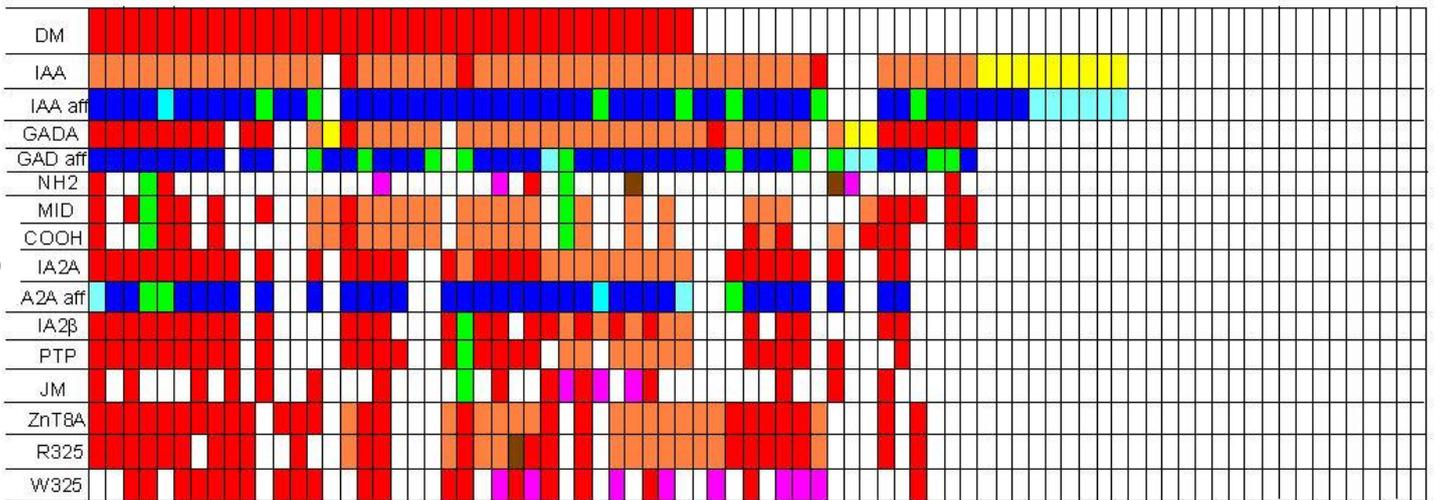
**Abbildung 20** Life Table Analyse: Kumulatives Risiko für die Entwicklung eines T1DM in einem Zeitraum von 10 Jahren nach der Entwicklung multipler Ak bei Kindern der Early Gruppe (rote Kurve) und bei Kindern der Late Gruppe (schwarze Kurve)

Abbildung 21 zeigt zusammenfassend die Autoimmunitätsmuster in der Early und Late Gruppe bei Serokonversion und die Entwicklung im Gesamtverlauf für jedes einzelne Kind.

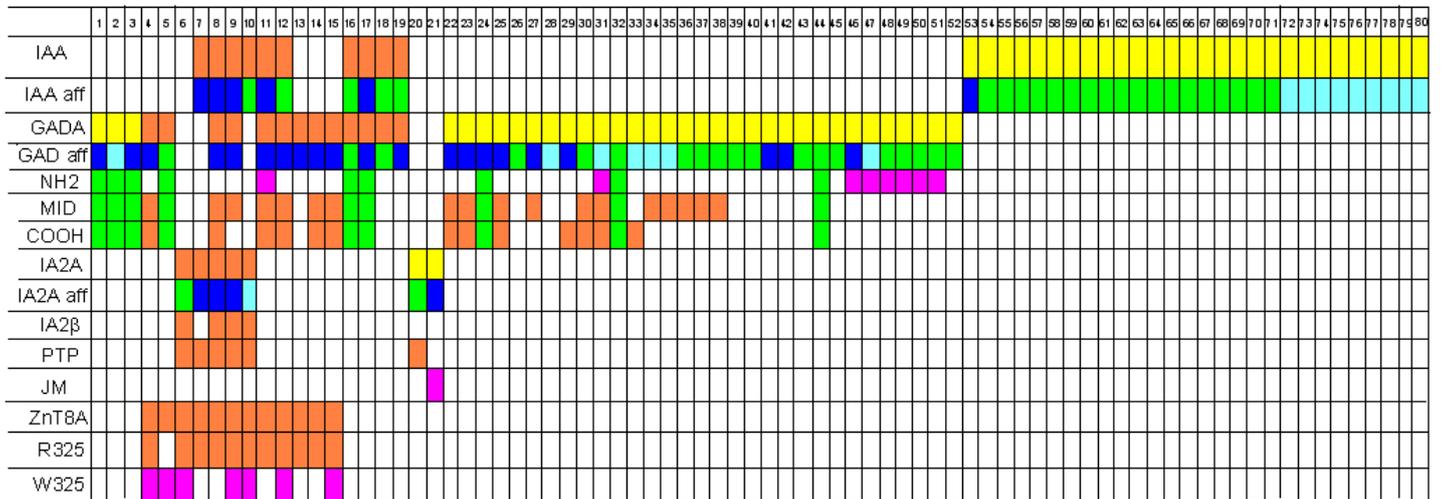
**A**



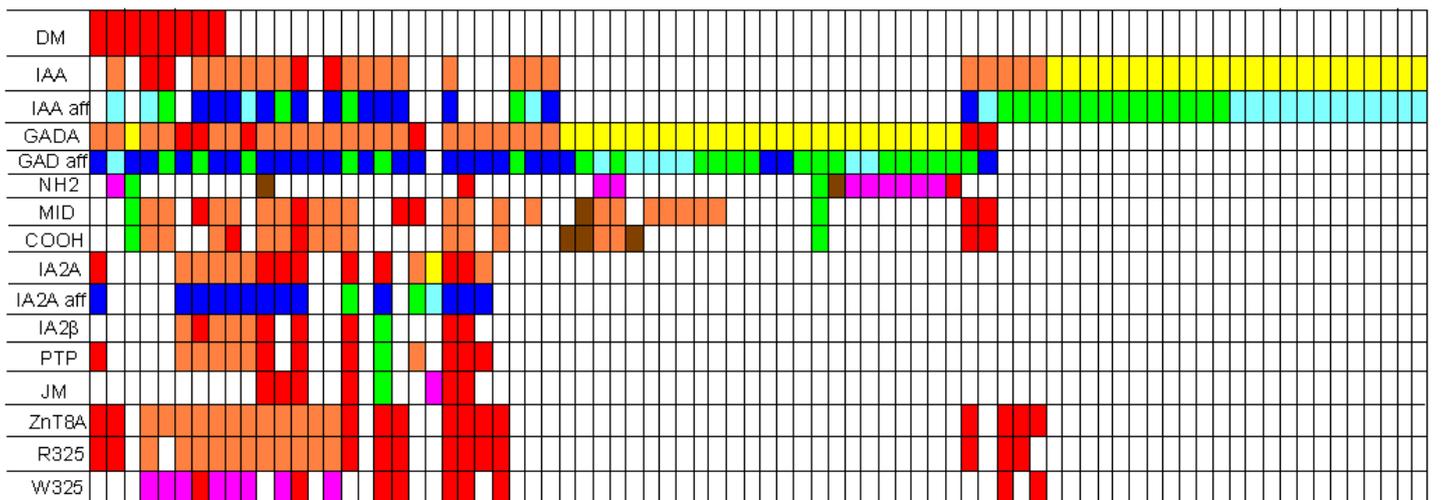
**B**



**C**



**D**



**Abbildung 21** Autoimmunitätsmuster der Early und LateGruppe im Verlauf;  
Die Querzeilen stehen für den jeweiligen Marker; jede Längsspalte repräsentiert ein Kind (**A** und **B**: 62 Kinder der Early Gruppe, **C** und **D**: 80 Kinder der Late Gruppe); jeweils obere Bildhälfte (**A** und **C**): AAK-Profile bei Serokonversion (= erstmaliges Auftreten von Insel-Autoimmunität), jeweils untere Bildhälfte (**B** und **D**): Veränderung der Profile für jedes einzelne Kind im gesamten Nachverfolgungszeitraum; **rot**: T1DM und Neuentwicklung eines Merkmals; **braun**: Verlust eines Merkmals; **orange**: multiple Autoantikörper, und häufig erkannte Epitope (MID,COOH,IA-2 $\beta$ ,PTP und ZnT8A-Arginin); **gelb**: singulärer Autoantikörper; **rosa**: seltener erkannte Epitope(NH<sub>2</sub>,JM,ZnT8A-Tryptophan); **dunkelblau**: hohe Affinität; **hellblau**: niedrige Affinität; **grün**: nicht gemessen; weiß: negativ für jeweiligen Marker

## 6. Diskussion

Der Typ 1 Diabetes mellitus ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen des Kindesalters, und wird durch eine autoimmune Zerstörung der Betazellen der Langerhans-Inseln im Pankreas hervorgerufen. Autoantikörper gegen Insulin, GAD, IA-2 und ZnT8 stellen wichtige Marker für das Ausmaß der Betazell-Zerstörung dar. Durch die genaue Charakterisierung der Autoantikörperantwort und durch Genotypisierung kann das Erkrankungsrisiko von erstgradigen Verwandten von Personen mit T1DM vorhergesagt werden. Personen mit einem hohem Risiko können so identifiziert, und in Präventionsprogramme eingeschlossen werden. Hummel et al. zeigten unter Anderen anhand der BABYDIAB Kohorte 2004, dass das Alter beim erstmaligen Auftreten von Autoimmunität das Risiko der Progression zum T1DM beeinflusst (Hummel, Bonifacio et al. 2004). Basierend auf diesen Beobachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit, im Rahmen der BABYDIAB Studie, die humorale Autoimmunantwort bei 142 bestätigt Autoantikörperpositiven Kindern von Eltern mit T1DM analysiert. Verschiedene Autoantikörper-Merkmale wurden dabei zum Zeitpunkt der Serokonversion bzw. zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von Antigen-spezifischer Autoimmunität sowie im kurzfristigen Verlauf von ein bis zwei Jahren untersucht. Zur Bestimmung altersspezifischer Autoantikörperprofile wurden die unterschiedlichen Charakteristika zwischen 62 Kindern mit frühkindlicher Inselautoimmunität (Kinder, die eine Autoreaktivität gegen Inselzellen vor dem 4. Lebensjahr entwickelten; medianes Alter bei Serokonversion: 1,9 Jahre), und 80 Kindern mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität (Kinder, bei denen Inselautoimmunität erst mit 4 Jahren oder später auftrat; medianes Alter bei Serokonversion: 8,0 Jahre), verglichen. Folgende humorale Marker wurden untersucht: Autoantikörperanzahl, Autoantikörperspezifität, Epitopspezifität, Autoantikörper-Titer, Autoantikörper-Affinität sowie HLA-Klasse-II-, INS VNTR- und SLC30A8- Genotyp.

Bisher gibt es keine Studie, in der so viele Autoantikörper-Charakteristika in den zwei oben genannten Altersgruppen untersucht und verglichen wurden. Vor allem eine genaue Analyse der Autoimmunantwort bei Kindern, die erst in einem späteren Alter Autoantikörper entwickeln, blieb bisher aus. Die vergleichende Analyse der Autoimmunitätsmuster beim erstmaligen Auftreten von Inselautoimmunität bzw. beim erstmaligen Auftreten einer Antigen-spezifischen Autoimmunität, sowie die Betrachtung der Progression innerhalb eines kurzen Verlaufs in den beiden untersuchten Gruppen, erlaubt eine bessere Einschätzung, welche Immunisierungsmuster für eine schnelle Progression der Autoimmunantwort prädisponieren, und welche nicht.

Weitere Stärken der vorliegenden Arbeit sind die relativ große Anzahl an Autoantikörper-positiven Verwandten die untersucht wurden, und die dadurch eine Aufteilung in zwei ungefähr gleich große vergleichbare Gruppen erlaubte, sowie die Länge der Nachverfolgungszeit in beiden Gruppen. Die Beobachtung der Kinder vom Zeitpunkt der Geburt an, ermöglichte eine ziemlich genaue Festlegung des Zeitpunktes der Serokonversion zu Insel-AAk Positivität. Da die BABYDIAB Studie nur Kinder innerhalb Deutschlands rekrutierte, beziehen sich die Ergebnisse dieser Arbeit nur auf die untersuchte Population, und können nicht auf andere geographische Regionen bezogen werden. In der vorliegenden Studie wurden nur erstgradig Verwandte von Typ 1 Diabetikern untersucht, weshalb die Ergebnisse dieser Arbeit nicht auf die Allgemeinbevölkerung übertragen werden können. Die Bestimmung und Analyse der Autoantikörper-Subklassen könnte in weiterführenden Arbeiten zur weiteren Charakterisierung der Profile beitragen. Weitere limitierende Faktoren der vorliegenden Arbeit sind, dass Probenmaterial nicht für jede Untersuchung vorhanden war, weshalb für einige Analysen die untersuchte Kohorte kleiner war, als für andere Auswertungen, und dass die Messung der verschiedenen Autoantikörper-Charakteristika nicht gleichzeitig erfolgte, sondern in einem Verlauf über Jahre, und so eventuelle Fehler durch inter-Assay Variabilität zulässt.

### ***Charakterisierung der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität***

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Kinder, die eine Autoreaktivität gegen Inselzellen vor dem 4. Lebensjahr entwickelten, oftmals Autoantikörper-Charakteristika aufwiesen, die mit einem erhöhten T1DM Risiko einhergehen. Außerdem wiesen sie meist sehr dynamische Verläufe innerhalb des kurzen Zeitraumes bis zur Follow-up-Probe auf. Obwohl die Mehrheit der Kinder zum Zeitpunkt der Serokonversion singuläre Autoantikörper aufwies, wurden bereits häufig (bei 44%) multiple Autoantikörper beobachtet. Das Auftreten multipler Autoantikörper in der ersten Serumprobe könnte entweder für eine sehr schnelle Ausweitung der Immunantwort von einem primären Zielantigen auf weitere Zielantigene, oder für eine gleichzeitige Immunisierung gegen mehrere Antigene sprechen (Ziegler, Hummel et al. 1999). Im Verlauf von etwa ein bis zwei Jahren hatten bereits 73% der Personen mit frühkindlicher Inselautoimmunität durch schnelle Progression der Immunantwort, multiple Autoantikörper entwickelt. In vorhergehenden Studien war das Vorkommen multipler Inselautoantikörper mit einem höheren Progressionsrisiko zum T1D verbunden, als das Vorkommen eines einzelnen Autoantikörpers (Bingley, Christie et al. 1994; Kulmala, Savola et al. 1998; Gardner, Gale et al. 1999; Achenbach, Warncke et al. 2004; Bingley 2010).

Bei Kindern mit frühkindlicher Inselautoimmunität war die primäre Immunantwort fast immer gegen Insulin gerichtet. GAD-Autoantikörper wurden ebenfalls häufig beobachtet. Dagegen traten Autoantikörper gegen IA-2 und ZnT8 seltener bei Serokonversion auf, und waren fast ausschließlich mit dem Vorkommen multipler Autoantikörper assoziiert. Die vorliegenden Daten bestätigen die Ergebnisse weiterer Studien, in denen Insulin als frühes Antigen beschrieben wurde, und in denen beobachtet wurde, dass IAA vor allem bei jungen Kindern sehr häufig vorkommen (Ziegler, Hummel et al. 1999; Kimpimaki, Kulmala et al. 2002; Hummel, Bonifacio et al. 2004). Im kurzfristigen Verlauf von 1-2 Jahren nach dem ertsmaligen Auftreten von Autoimmunität, trat innerhalb der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität bei 59% der Kinder intermolekulares Autoantikörper-Spreading auf weitere Zielantigene auf. Hierbei konnte vor allem ein signifikanter Anstieg der Prävalenzen von IA-2A und ZnT8A beobachtet werden, für die in vorhergehenden Studien ein erhöhtes T1DM-Risiko im Vergleich zu den anderen beiden Autoantikörpern beschrieben wurde (Christie, Genovese et al. 1994; Decochez, De Leeuw et al. 2002; Achenbach, Warncke et al. 2004). Das spätere Auftreten von Autoantikörpern gegen IA-2 und ZnT8 im Vergleich zu IAA und GADA, stimmt mit den Beobachtungen vorhergehender Studien überein (Hawa, Rowe et al. 1997; Ziegler, Hummel et al. 1999; Kimpimaki, Kulmala et al. 2002; Achenbach, Lampasona et al. 2009). Möglicherweise entwickeln sich IA-2A und ZnT8A nur dann, wenn bereits aktive oder passive Betazell-Zerstörung stattfindet. Diese Annahme wird durch eine Studie gestützt, in der Personen mit langem Diabetes-Verlauf allogene Inseln transplantiert wurden: Bei diesen Personen wurden GADA sofort detektiert, während IA-2A nur dann auftraten, wenn bereits Allo-Immunität nachgewiesen wurde (Bosi, Braghi et al. 2001).

Durch Bestimmung der Autoantikörper Titer, wurde die Intensität der Autoantikörper-Antwort analysiert. Hierbei konnte innerhalb der Gruppe mit Kindern, welche Inselautoimmunität vor dem 4. Lebensjahr entwickelten, eine sehr hohe Intensität sowie ein sehr dynamisches Titer-Verhalten beobachtet werden. Diese Kinder wiesen bereits bei Serokonversion vor allem hohe IAA Titer auf, welche sich im Verlauf zur Follow-up-Probe signifikant erhöhten. Achenbach et al. zeigten 2004, dass hohe IAA-Titer mit einem erhöhten T1DM-Risiko einhergehen (Achenbach, Warncke et al. 2004). Auch die GADA-Titer stiegen innerhalb der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität nach ein bis zwei Jahren signifikant an, bisher wurde jedoch keine Assoziation zwischen hohen GADA-Titern und erhöhtem T1DM Risiko beschrieben.

Die Untersuchung von Antigen-spezifischen Merkmalen zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von GADA ergab, dass bei Kindern der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität, Autoantikörper gegen Epitope von GAD am häufigsten GAD-MID und GAD-COOH erkannten. Dagegen kamen Autoantikörper gegen GAD-NH<sub>2</sub> seltener vor, und wurden häufig erst nach dem Auftreten von Antikörpern gegen GAD-MID und GAD-COOH beobachtet.

Die typischen Verteilungsmuster in der jeweils ersten GADA-positiven Probe waren Reaktivität gegen GAD-MID und GAD-COOH oder restringierte Reaktivität gegen GAD-MID. Im Verlauf wurde innerhalb dieser Gruppe bei 42% der Kinder intramolekulares Spreading auf weitere GAD-Epitope, vor allem auf GAD-COOH, beobachtet. In der Follow-up-Probe hatten somit bereits 65% der Kinder multiple Ak gegen GAD-Epitope ( Reaktivität gegen GAD-COOH und GAD-MID oder gegen alle drei GAD-Epitope). Diese Daten bestätigen Beobachtungen vorhergehender Arbeiten (Bonifacio, Lampasona et al. 2000; Hoppu, Ronkainen et al. 2004). Ein selteneres Verteilungsmuster war restringierte GAD-NH<sub>2</sub> Reaktivität. Dieses Muster kam nur bei einem einzigen singulär GADA-positivem Kind der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität vor, blieb im Gesamtverlauf konstant und war nicht mit einer Progression zu multiplen AAK oder zum T1DM assoziiert. Dies spricht dafür, dass restringierte GAD-NH<sub>2</sub> Reaktivität als ein Charakteristikum betrachtet werden kann, welches nicht mit Progression einhergeht, sondern eher für einen chronischen Verlauf prädisponiert. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus früheren Untersuchungen am selben Kollektiv (Mayr, Schlosser et al. 2007). In dieser Studie wurde gezeigt, dass Kinder mit multiplen Autoantikörpern vor allem hoch affine GAD-Antikörper, als Zeichen einer ausgereiften Immunantwort aufweisen, und Kinder mit singulärer GAD-Reaktivität oftmals niedrig affine GADA haben. Dies konnte in den vorliegenden Daten bestätigt werden. Kinder mit frühkindlicher Inselautoimmunität, die sehr häufig multiple Autoantikörper hatten, wiesen in beiden untersuchten Proben fast ausschließlich ausgereifte, hoch affine GADA auf. Zusammenfassend lassen die Beobachtungen zu den GAD-Epitopen vermuten, dass einige GADA-spezifische Merkmale, wie beispielsweise hohe GADA-Titer und Reaktivität gegen multiple Epitope (vor allem gegen GAD-COOH und GAD-MID) sowie hohe GADA Affinität eher zu einem progressiven Verlauf prädisponieren und, dass diese vor allem bei jungen Kindern beobachtet werden können. Wiederum andere Merkmale, wie restringierte GAD-NH<sub>2</sub> Reaktivität und niedrige GADA Affinität deuten dagegen eher auf einen chronischen Verlauf hin, finden sich innerhalb der Gruppe, in der Inselautoimmunität bereits vor dem 4. Lebensjahr auftritt, jedoch seltener.

Bei Kindern der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität erkannten Autoantikörper beim erstmaligen Auftreten von Reaktivität gegen IA-2 am häufigsten die PTP-Region von IA-2 und IA-2 $\beta$ . Autoantikörper gegen IA-2-JM wurden seltener gefunden. Die häufigsten Epitopverteilungsmuster waren: Reaktivität gegen IA-2-PTP und IA-2 $\beta$ , Reaktivität gegen alle drei Epitope, sowie restringierte IA-2-PTP-Reaktivität. Die Beobachtungen der vorliegenden Studie unterscheiden sich von denen vorhergehender Arbeiten (Bonifacio, Lampasona et al. 1998; Naserke, Ziegler et al. 1998). Hier wurde initiale IA-2 Reaktivität vor allem gegen die JM- und PTP-Region von IA-2 beobachtet, JM als frühes Ziel der Immunreaktion gegen IA-2 beschrieben, von dem ein Spreading auf die PTP-Region von IA-2 und IA-2 $\beta$  ausgeht und dass Reaktivität gegen die juxtamembranäre Region von IA-2 mit einem erhöhten Diabetes Risiko erhöht ist. Reaktivität gegen IA-2 $\beta$  wurde immer erst nach dem Auftreten von IA-2 spezifischen Antikörpern, im Rahmen einer Expansion der Immunantwort gegen IA-2 beschrieben. Eine Erklärung dafür, dass IA-2 $\beta$ -Autoantikörper in unserer Studie oftmals bereits beim erstmaligen Auftreten von IA-2-Autoantikörpern auftraten, wäre eine sehr schnelle Ausweitung der Immunantwort gegen IA-2. Durch eine schnelle Ausweitung der Immunantwort auf weitere IA-2-Epitope, wiesen in der Follow-up Probe bereits 77% der Kinder der Early Gruppe Autoantikörper gegen IA-2 $\beta$  auf, ein Marker der das T1DM Risiko bei IA-2A-positiven Personen noch weiter erhöht (Christie, Genovese et al. 1994; Achenbach, Bonifacio et al. 2008). Intramolekulares Spreading trat im Verlauf von ein bis zwei Jahren bei etwa 50% der Kinder auf, und die meisten Personen hatten in diesem Zeitraum Autoantikörper gegen multiple IA-2-Epitope entwickelt. In der Follow-up-Probe wiesen Kinder der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität somit am häufigsten Reaktivität gegen alle drei IA-2-Epitope sowie Reaktivität gegen PTP und IA-2 $\beta$  auf. Bonifacio et al. beobachteten 1998, dass Reaktivität gegen multiple IA-2-Epitope mit einem erhöhten T1DM Risiko einhergeht (Bonifacio, Lampasona et al. 1998). IA-2A-Affinitäten, als Marker für den Reifegrad der IA-2-Autoantikörper, waren bei der Mehrheit der Kinder der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität sowohl beim erstmaligen Auftreten von IA-2, als auch im Follow-up hoch. Somit zeigten Kinder der jungen Gruppe auch bezüglich der IA-2A-spezifischen Merkmale sehr häufig Charakteristika, die mit Progression verbunden sind. Als solche Risiko-Marker wären Reaktivität gegen IA-2 $\beta$ , Autoantikörper gegen multiple IA-2-Epitope (vor allem gegen IA-2-PTP und IA-2 $\beta$ ), und hohe IA-2A-Affinität zu nennen.

In einer vorhergehenden Studie desselben Kollektivs wurde gezeigt, dass das zusätzliche Auftreten von ZnT8A bei Insel-AAK positiven Kindern das Risiko einen T1D zu entwickeln weiter stratifiziert, und dass diese Risikostratifizierung durch Analyse des SLC30A8 SNP rs13266634 Genotyps noch verbessert werden kann.

So zeigten Kinder mit homozygoten SLC30A8 SNP rs13266634 Genotypen ein höheres Progressionsrisiko, als ZnT8A positive Kinder mit heterozygotem SLC30A8 SNP rs13266634 Genotypen (Achenbach, Lampasona et al. 2009). Restringierte ZnT8A-Arginin Reaktivität kam viel häufiger bei Kindern mit homozygoten SLC30A8 R325-kodierenden Allelen vor, als bei Kindern mit mindestens einem SLC30A8 W325-kodierendem Allel. Dasselbe galt für restringierte ZnT8A-Tryptophan Reaktivität, welche niemals bei Kindern mit homozygoten SLC30A8 R325-kodierenden Allelen gefunden wurde.

Bei Betrachtung der Ak gegen die ZnT8-Isoepitope in der vorliegenden Arbeit, zeigten Kinder, bei denen eine Reaktivität gegen Inselzellen bereits vor dem 4. Lebensjahr auftrat, beim erstmaligen Auftreten von ZnT8A am häufigsten Autoantikörper gegen beide Hauptvarianten (ZnT8RA und ZnT8WA), gefolgt von restringierter ZnT8RA-Reaktivität (= ZnT8-Arginin). Dagegen kam restringierte ZnT8WA- Reaktivität (= ZnT8-Tryptophan) nur selten vor. Im Verlauf von ein bis zwei Jahren gab es bei etwa 20% Epitop-Spreading.

Verlust von Reaktivität trat jedoch auch bei ungefähr 20% der Kinder auf. In der Follow-up-Probe änderte sich somit nichts in Bezug auf Prävalenzen oder Verteilungsmuster der Autoantikörper gegen die ZnT8-Hauptvarianten.

In der vorliegenden Arbeit wiesen etwa 85% der Kinder mit frühkindlicher Autoreaktivität gegen Inselzellen in beiden untersuchten Serumproben hoch affine, ausgereifte Insulin-Autoantikörper auf. In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass Kinder mit hoch affinen IAA häufiger multiple Autoantikörper und T1DM entwickeln als Kinder mit niedrig affinen IAA (Achenbach, Koczwara et al. 2004; Schlosser, Koczwara et al. 2005). Das Vorkommen von hoch affinen IAA, ist somit ein weiterer Risiko-Marker, der sehr häufig bei Kindern der jungen Gruppe gefunden wurde.

### ***Charakterisierung der Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität***

Viele Studien haben bereits das Auftreten von Autoantikörpern bei Neugeborenen und Kleinkindern untersucht (Rewers, Norris et al. 1996; Ziegler, Hummel et al. 1999; Kimpimaki, Kupila et al. 2001). Dagegen gibt es bisher kaum Arbeiten zur Charakterisierung der Autoimmunitätsprofile zum Zeitpunkt der Serokonversion bei älteren Kindern (Simell, Winter et al. 2010; Vermeulen, Weets et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals eine detaillierte Untersuchung der Insel-Autoimmunität bei älteren Kindern unter Einbeziehung so vieler humoraler Marker. In unseren Untersuchungen wiesen Kinder, die eine Autoreaktivität gegen Inselzellen mit 4 Jahren oder später entwickelten, am häufigsten Autoantikörper-Merkmale auf, die nicht mit einem erhöhten T1DM Risiko assoziiert sind.

Im kurzfristigen Verlauf zeigten sich bei einer Großzahl der Kinder keine Veränderungen der Autoantikörperprofile, als Zeichen eines eher chronischen Verlaufs, ohne Progression. Zum Zeitpunkt der Serokonversion wiesen die meisten Kinder der Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität singuläre Autoantikörper auf.

Im Gegensatz zu Kindern der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität, hatten hier mit etwa 20% signifikant weniger Personen multiple Autoantikörper in der ersten Serumprobe. Im Verlauf von ein bis zwei Jahren wurde, im Vergleich zu Kindern bei denen Inselautoimmunität bereits vor dem 4. Lebensjahr auftrat, keine signifikante Veränderung bezüglich des Autoantikörper-Status beobachtet. Nach dieser kurzen Verlaufszeit wies weiterhin die Mehrheit der Kinder singuläre Autoantikörper auf; nur 29% der Personen hatten multiple Autoantikörper entwickelt, und damit einen Risikofaktor für die Entwicklung eines T1D (Bingley, Christie et al. 1994; Kulmala, Savola et al. 1998; Gardner, Gale et al. 1999; Achenbach, Warncke et al. 2004).

Kinder, die eine Autoreaktivität gegen Inselzellen erst mit 4 Jahren oder später entwickelten, hatten bei Serokonversion am häufigsten Autoantikörper, die singulär gegen GAD gerichtet waren, was dafür sprechen könnte, dass häufig bei Kindern, die erst später im Leben Autoantikörper entwickeln, GAD als primäres Antigen fungiert. Ähnliche Beobachtungen bei Erwachsenen Patienten konnten bereits in anderen Arbeiten gemacht werden (Karjalainen, Salmela et al. 1989; Vandewalle, Decraene et al. 1993; Zimmet 1995; Vandewalle, Coeckelberghs et al. 1997). Bei etwa der Hälfte der Kinder war jedoch die primäre Immunantwort gegen Insulin gerichtet. Hierbei zeigte sich am häufigsten singuläre Autoreaktivität gegen Insulin. Dies weist darauf hin, dass es innerhalb dieser Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität durchaus auch Kinder gibt, bei denen GAD nicht das primäre Antigen ist. Autoantikörper gegen IA-2 und ZnT8 kamen, wie bereits für die Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität beschrieben, in der ersten AAK-positiven Serumprobe seltener vor, und waren mit dem Vorkommen multipler Autoantikörper assoziiert. Eine Ausweitung der Immunantwort auf weitere Zielantigene im Verlauf zur Follow-up-Probe wurde bei Kindern, bei denen Inselautoimmunität erst mit 4 Jahren oder später auftrat, mit nur 16% ebenfalls signifikant seltener beobachtet als bei den jüngeren Kindern. So wiesen Kinder der Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität auch in der zweiten Serumprobe am häufigsten singuläre GAD- oder singuläre Insulin-Autoantikörper auf.

Die Prävalenzen für IA-2A und ZnT8A, stiegen zwar auch innerhalb dieser Gruppe an, diese beiden Autoantikörper wurden jedoch signifikant seltener als in der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität gefunden.

Vermeulen et al. beschrieben in ihrer Arbeit über AAK bei älteren Kindern mit T1D-Risiko ebenfalls das spätere Auftreten von IA-2A und ZnT8A im Vergleich zu IAA und GADA im subklinischen Krankheitsprozess (Vermeulen, Weets et al. 2012). Diese Beobachtung ist der Assoziation dieser beiden AAK mit schneller Progression zum T1D kompatibel (Decochez, De Leeuw et al. 2002; Achenbach, Lampasona et al. 2009; De Grijse, Asanghanwa et al. 2010). Somit zeigten Kinder der Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität nicht nur in Bezug auf den Autoantikörper-Status, sondern auch bezüglich der Autoantikörper-Spezifität seltener Risikomuster als Personen, bei denen Inselautoimmunität bereits vor dem 4. Lebensjahr auftrat.

Bei Betrachtung der Autoantikörper-Titer, wiesen Kinder, die eine Autoreaktivität gegen Inselzellen erst mit 4 Jahren oder später entwickelten, sowohl bei Serokonversion als auch in der Follow-up-Probe signifikant niedrigere IAA- und GADA-Titer auf als Kinder der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoreaktivität, und zeigten somit eine geringere Intensität der Immunantwort. Achenbach et al. beschrieben 2004 ein erhöhtes T1D-Risiko für Kinder mit hohen IAA-Titern (Achenbach, Koczwara et al. 2004). Das Titer-Verhalten von Personen der Late Gruppe war im Gegensatz zur jüngeren Gruppe chronisch. IAA- und GADA-Titer blieben im Verlauf von ein bis zwei Jahren sehr stabil und änderten sich kaum.

Die Analyse der Immunantwort gegen Epitope von GAD zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von GAD-Antikörpern zeigte, dass bei Kindern der Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität, wie auch bei Kindern der Gruppe frühkindlicher Inselautoimmunität, Autoantikörper am häufigsten GAD-MID und GAD-COOH erkannten. Dagegen kamen Antikörper gegen GAD-NH<sub>2</sub> seltener vor, und wurden auch hier häufig erst nach dem Auftreten von Antikörpern gegen GAD-COOH und GAD-MID beobachtet. Diese Daten bestätigen Beobachtungen vorhergehender Arbeiten (Bonifacio, Lampasona et al. 2000; Hoppu, Ronkainen et al. 2004). In der jeweils ersten GADA-positiven Probe wurde am häufigsten Reaktivität gegen GAD-MID und GAD-COOH oder restringierte Reaktivität gegen GAD-MID beobachtet.

Ein selteneres Verteilungsmuster war restringierte GAD-NH<sub>2</sub> Reaktivität. Dieses Muster kam jedoch häufiger in der älteren Gruppe als in der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoreaktivität vor, und Kinder die dieses Muster aufwiesen, zeigten im Gesamtverlauf kein GAD-Epitop-Spreading. Außerdem waren alle dieser Personen im Gesamtverlauf singular GADA positiv und entwickelten keinen T1DM, was mit vorhergehenden Beobachtungen desselben Kollektivs konform geht (Mayr, Schlosser et al. 2007). Im kurzfristigen Verlauf zeigten Personen der Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität abermals seltener dynamische Verläufe als Kinder der jüngeren Gruppe, und wiesen nur in 20% der Fälle intramolekulares Spreading auf weitere GAD-Epitope auf. In der Follow-up-Probe gab es somit zwar in beiden Gruppen häufiger Kinder mit multiplen Epitopen (GAD-COOH und GAD-MID oder alle drei GAD-Epitope) als in der ersten Probe, Reaktivität gegen multiple GAD-Epitope wurde dennoch signifikant häufiger bei Kindern der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität beobachtet. Reaktivität gegen multiple Epitope war in beiden Gruppen mit höheren GADA-Titern assoziiert, was mit der bereits oben beschriebenen Beobachtung, dass Kinder der jüngeren Gruppe vor allem in der Follow-up-Probe höhere GADA-Titer als Kinder der älteren Gruppe aufwiesen, zusammenpasst. Mayr et al. beschrieben bereits 2007, dass GADA-Affinitäts-Messungen dazu beitragen können das T1D-Risiko besser einschätzen zu können (Mayr, Schlosser et al. 2007). Wie in der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität, hatten auch in der älteren Gruppe Personen mit multiplen Autoantikörpern fast immer hoch affine GADA. Kinder, bei denen Inselautoimmunität erst mit 4 Jahren oder später auftrat, wiesen jedoch insgesamt zu beiden untersuchten Zeitpunkten in über 70% der Fälle hoch affine GADA auf (singular GADA positive Kinder eingeschlossen). Das häufige Auftreten hoch affiner GADA innerhalb dieser Gruppe lässt sich zum Teil dadurch erklären, dass nur bei einem kleinen Teil der singular GADA-positiven Kinder Proben zur Affinitätsmessung zur Verfügung standen, und eventuell der Großteil der nicht gemessenen Proben niedrige Affinitäten aufgewiesen hätte. Außerdem wäre es denkbar, dass diejenigen singular GADA positiven Kinder mit hoher Affinität eventuell zu einem späteren Zeitpunkt eine Progression zu multiplen AAK durchmachen. Zusammenfassend wiesen Kinder der älteren Gruppe zwar ebenfalls zum Teil GADA-spezifische Charakteristika auf, die mit Progression einhergehen, Merkmale die nicht mit Progression einhergehen, wie restringierte GAD-NH<sub>2</sub>-Reaktivität, singuläre GAD-Epitop-Reaktivität sowie niedrig affine GADA, kamen jedoch häufiger vor.

Die Analyse der IA-2-Epitope sowie der IA-2A-Affinität wies bei den zwei untersuchten Gruppen große Ähnlichkeiten auf. Es konnten weder in Bezug auf die IA-2-Epitop-Prävalenz noch bezüglich der IA-2-Epitop-Verteilungsmuster signifikante Unterschiede beobachtet werden. IA-2A-Affinitäten waren in beiden untersuchten Proben bei fast allen Kindern hoch, und unterschieden sich ebenfalls nicht zwischen den zwei Gruppen.

Das einzige singular IA-2A positive Kind aus der Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität zeigte im Gesamtverlauf restringierte Reaktivität gegen JM sowie eine niedrige IA-2-Affinität, verlor im Verlauf Reaktivität gegen IA-2 und entwickelte keinen T1DM. Möglicherweise könnten Merkmale, wie restringierte JM-Reaktivität und niedrige IA-2A-Affinität eher für einen chronischen Verlauf, trotz IA-2A Positivität sprechen. Obwohl Kinder der jüngeren Gruppe in den vorliegenden Daten signifikant häufiger IA-2A aufwiesen als Kinder der Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität, so unterschieden sich die beiden Gruppen nicht bezüglich der IA-2-spezifischen Charakteristika. IA-2A sind mit einem erhöhten T1DM Risiko assoziiert, und das Vorkommen von IA-2 $\beta$ , von Reaktivität gegen multiple Epitope, sowie von hoch affinen IA-2A erlaubt eine weitere Stratifizierung dieses Risikos (Christie, Genovese et al. 1994; Bonifacio, Lampasona et al. 1998; Achenbach, Bonifacio et al. 2008).

Auch bei Betrachtung der ZnT8-Epitope konnte kein Unterschied zwischen der Kindern mit frühkindlicher und Kindern mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität beobachtet werden. Daher lässt sich für die Beobachtung von ZnT8A in den vorliegenden Daten sagen, dass Autoantikörper gegen ZnT8, für welche bereits eine Assoziation mit einer schnellen Progression zum T1D beschrieben wurde (Achenbach, Lampasona et al. 2009; De Grijse, Asanghanwa et al. 2010) zwar häufiger innerhalb der jüngeren Gruppe beobachtet werden konnten, sich jedoch die ZnT8A-spezifischen Charakteristika in beiden Gruppen sehr stark ähnelten.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich große Unterschiede bezüglich der IAA-Affinität zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Wie bereits weiter oben beschrieben, ist hohe IAA-Affinität ein Marker, der eher zu Progression zu multiplen Autoantikörpern und zum T1DM prädisponiert, wohingegen niedrig affine IAA eher auf einen chronischen Verlauf hindeuten (Achenbach, Koczwara et al. 2004; Schlosser, Koczwara et al. 2005). Kinder, die erst mit 4 Jahren oder später Inselautoimmunität entwickelten, hatten in beiden Serumproben signifikant häufiger niedrig affine Insulin-Autoantikörper als Personen der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität, und damit ein weiteres Risiko-Merkmal seltener als die jüngeren Kinder.

### **Fazit Autoantikörperprofile**

Die Analyse der vorliegenden Daten zeigte unterschiedliche *Autoantikörperprofile* und Verlaufsmuster, die zwar in beiden Gruppen vorkamen, sich jedoch in der *Frequenz* ihres Vorkommens stark *unterschieden*. Kinder der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoreaktivität zeigten oftmals ein sehr dynamisches, progressives Muster mit multiplen Autoantikörpern und Epitopen, Autoantikörper- und Epitop-Spreading, Titer-Anstiegen und hohen AAK-Affinitäten. Dagegen wiesen Kinder, bei denen Inselautoimmunität erst im Alter von 4 Jahren oder später auftrat, am häufigsten chronische Verläufe mit meist nur einem positiven Autoantikörper (meistens GADA oder IAA) und konstanter singulärer Positivität, mit oftmals singulärer GAD-Epitop-Reaktivität, sowie mit stabilen Autoantikörper-Titern und niedrigen AAK-Affinitäten auf. Es ist denkbar, dass die dynamische Form durch ein Zusammenspiel von genetischen- und Umweltfaktoren zu frühen Zeitpunkten ausgelöst wird, welches zu einer Störung von Immunregulationsmechanismen führt, die normalerweise die autoimmune Zerstörung von Beta-Zellen der Pankreasinseln regulieren würden. Bei Kindern mit chronischen Verlaufsformen richtete sich die Immunreaktion oftmals gegen GAD. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Autoantikörper gegen GAD, die auch bei anderen Autoimmunerkrankungen vorkommen, eine weniger aggressive Immunreaktion reflektieren, die nicht zwangsläufig zu einer Betazellzerstörung führt.

### **Genotyp und Progression zu multiplen Autoantikörpern**

HLA-Klasse-II Gene tragen bis zu 50% zum gesamten genetischen Typ 1 Diabetes Risiko bei, und gelten somit als sehr wichtige Prädiktoren für die Entwicklung von Inselautoimmunität und T1DM.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich die von uns untersuchten Gruppen bezüglich der HLA-Klasse-II-Genotypen unterschieden. So kamen Hochrisiko-Genotypen signifikant häufiger bei Kindern mit frühkindlicher Inselautoimmunität vor, wohingegen protektive Genotypen häufiger in Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität vorzufinden waren. Vorhergehende Beobachtungen der BABYDIAB Kohorte zeigten bereits, dass bestimmte genetische Risikofaktoren, die bei Kindern mit multiplen Autoantikörpern vorkommen, bei Kindern mit singulärer Autoantikörper-Positivität fehlen (Walter, Albert et al. 2003; Achenbach, Warncke et al. 2004). Auch Ergebnisse der Australischen BABYDIAB Studie wiesen auf, dass Hoch-Risiko-Haplotypen wie HLA DR4-DQ8 und DR3-DQ2 häufiger bei Kindern mit multiplen Antikörpern vorkamen, als bei Kindern mit singulärer oder transients Autoantikörper-Positivität (Colman, Steele et al. 2000).

Diese Daten passen zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, in denen Kinder, bei denen Inselautoimmunität vor dem 4. Lebensjahr auftrat, häufiger Hochrisiko- Genotypen aufwiesen, und schließlich wesentlich häufiger multiple Antikörper und einen T1DM entwickelten als Kinder, die Autoantikörper gegen Inselzellene erst mit 4 Jahren oder später entwickelten, welche oftmals einen protektiven Genotyp hatten. Betrachtete man jedoch in beiden Gruppen nur diejenigen Kinder, die im Gesamtverlauf multiple Autoantikörper entwickelt hatten, gab es keine signifikanten Unterschiede mehr bezüglich der Genotyp-Verteilung. Daher wurde die Lifetable Analyse zur Berechnung des kumulativen Risikos multiple Antikörper zu entwickeln, für beide Gruppen zusammengefasst betrachtet.

Es zeigte sich, dass vor allem Kinder mit Hochrisiko-Genotypen gegenüber Personen mit neutralen oder protektiven Genotypen ein signifikant höheres Risiko aufwiesen multiple Autoantikörper zu entwickeln. Dagegen zeigten Kinder mit einem protektiven Genotyp ein signifikant geringeres Risiko multiple Antikörper zu entwickeln als Kinder mit allen übrigen Genotypen. Die Beobachtungen zum HLA-Klasse-II Genotyp in der vorliegenden Studie bestätigen zusammenfassend, dass HLA Hochrisiko-Genotypen, die mit Progression assoziiert sind, und protektive HLA-Genotypen, die eher zu einem chronischen Verlauf prädisponieren zwar in beiden Gruppen vorkommen, dass sie sich jedoch in der Frequenz des Vorkommens unterscheiden.

Auch für das Auftreten verschiedener INS VNTR Genotypen wurden risikosteigernde bzw. protektive Effekte in Bezug auf die Entwicklung multipler AAK und eines T1DM beschrieben. Der I/I INS VNTR Genotyp wurde mit einem erhöhtem Risiko assoziiert, wohingegen den I/III oder III/III INS VNTR Genotypen eher protektive Eigenschaften zugewiesen wurden (Walter, Albert et al. 2003). Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. In unseren Beobachtungen waren die INS VNTR Genotypen in beiden Gruppen ungefähr gleich verteilt, und Kinder mit I/I INS VNTR Genotyp hatten ein sehr ähnliches kumulatives Risiko multiple Autoantikörper zu entwickeln wie Kinder mit I/III oder III/III INS VNTR Genotyp. Mögliche Erklärungen hierfür wären einerseits die kleinen Fallzahlen in der vorliegenden Arbeit. Außerdem ist es denkbar, dass eine Bestimmung des INS VNTR Genotyps vor allem bei IAA positiven Personen eine weitere Möglichkeit zur Risiko-Stratifizierung bietet, da in vorhergehenden Studien vor allem eine Assoziation zwischen dem Vorkommen von IAA und I/I INS VNTR Genotyp beschrieben wurde (Graham, Hagopian et al. 2002; Walter, Albert et al. 2003).

Achenbach et al. zeigten 2009, dass bei ZnT8A positiven Kindern das T1DM-Risiko durch SLC30A8 Genotypisierung noch weiter stratifiziert werden kann (Achenbach, Lampasona et al. 2009). So hatten ZnT8A positive Personen, mit einem homozygoten (CC oder TT) SLC30A8 Genotyp ein höheres Risiko an Typ 1 Diabetes zu erkranken, als Personen mit heterozygotem (CT) SLC30A8 Genotyp. In der vorliegenden Studie waren homozygote und heterozygote SLC30A8 Genotypen in beiden Gruppen in etwa gleich verteilt, und es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Progression zu multiplen Antikörpern zwischen Kindern mit homozygotem und Kindern mit heterozygotem SLC30A8 Genotyp. Allerdings wurden hierbei sowohl ZnT8A-positive- als auch ZnT8A-negative Kinder beobachtet. Dieses Ergebnis bestätigt, dass eine Bestimmung des SLC30A8 Genotyps nur in Zusammenhang mit ZnT8A-Positivität zu einer weiteren Stratifizierung des T1DM Risikos beiträgt.

### **Progress zu multiplen Antikörpern und zum T1DM**

Wie bereits oben beschrieben, gab es in der vorliegenden Arbeit signifikant mehr Kinder der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität, die im gesamten Nachverfolgungszeitraum multiple Autoantikörper entwickelt hatten, als Kinder der älteren Gruppe (80,6% vs. 39%). Auch wenn man in beiden Gruppen nur diejenigen Personen betrachtete, die bei Serokonversion singularär Autoantikörper-positiv waren, war das Risiko eine Progression zu multiplen AAK durchzumachen in der jüngeren Gruppe signifikant höher.

Schaute man jedoch nur auf die Personen, die auch wirklich eine Progression zu multiplen Autoantikörpern durchmachten, zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Schnelligkeit dieser Progression vom Auftreten des ersten Autoantikörpers zwischen den beiden Gruppen. Ganz ähnlich verhielt es sich in Bezug auf die T1DM Entwicklung: Kinder, die bereits vor dem 4. Lebensjahr Inselautoantikörper entwickelt hatten, entwickelten signifikant häufiger einen T1DM als Kinder bei denen Inselautoantikörper erst mit 4 Jahren oder später auftraten (58,1% vs. 10%). Doch diejenigen Kinder, die eine Progression zum T1DM durchmachten, taten dies in beiden Gruppen gleich schnell, nachdem sie multiple Autoantikörper entwickelt hatten. Diese Ähnlichkeit der Progressionsrate unterstreicht, dass die Autoimmunitäts-Merkmale bei Kindern mit fortschreitender Autoimmunität, ungeachtet des Alters beim erstmaligen Auftreten von Inselautoimmunität, sehr ähnlich sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Kinder, die einen fortschreitenden Autoimmunitätsprozess aufweisen und schließlich einen T1DM entwickeln, ähnliche Autoantikörpermerkmale aufweisen, ungeachtet des Alters beim erstmaligen Auftreten von Inselautoimmunität. Gleichmaßen finden sich in beiden Gruppen andere Merkmale, die mit einem chronischen, nicht progressiven Verlauf assoziiert sind. Ein erheblicher Unterschied zwischen Kindern mit frühkindlicher und Kindern mit prä-/pubertärer Inselautoreaktivität ist jedoch die Frequenz prädiktiver Autoantikörpercharakteristika. So weisen Kinder der jüngeren Gruppe häufiger Merkmale auf, die mit Progression assoziiert sind, und Kinder der älteren Gruppe häufiger Charakteristika, die zu einem nicht progressiven, chronischen Verlauf prädisponieren. Diese Unterschiede der Häufigkeiten lassen sich wiederum durch das Vorkommen prädisponierender bzw. protektiver Genotypen sowie exogener Faktoren erklären. Der Ansatz der Multi-faktoriellen Analyse, sowie der Einsatz biomathematischer Modelle könnten dazu beitragen individuelle Immunisierungsprofile zu erklären, und somit die Möglichkeiten der Prädiktion des T1DM weiter verbessern.

## 7. Zusammenfassung

Erstgradige Verwandte von Patienten mit Typ 1 Diabetes haben ein erhöhtes Risiko gegenüber der Allgemeinbevölkerung Inselzellautoimmunität und schließlich auch einen T1DM zu entwickeln. Die Bestimmung von T1DM-spezifischen Autoantikörpern im Serum ist die derzeit beste Methode zum Nachweis von Inselzellautoimmunität. Das Auftreten von Autoantikörpern geht jedoch nicht in jedem Fall mit einer T1DM Entwicklung einher. Eine genaue Charakterisierung der humoralen Autoimmunantwort gegen Betazell-Antigene erlaubt eine weitere Stratifizierung des Risikos eine Progression des autoimmunen Zerstörungsprozesses durchzumachen, welche schließlich in der klinischen Manifestation der Erkrankung mündet. Bisherige Untersuchungen bei Kindern mit mindestens einem Elternteil mit T1DM zeigen, dass das Neuauftreten von Autoantikörpern in zwei Altersgruppen (im Alter von etwa 2 Jahren sowie im Alter von etwa 8 Jahren) besonders hoch ist. Eine genaue Charakterisierung dieser beiden Gruppen erfolgte bisher jedoch noch nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Autoantikörper-positive Kinder von Eltern mit T1DM gemäß dem Alter der beiden „Inselautoimmunitäts-Wellen“ in zwei Gruppen eingeteilt: Die Verlaufsseren von 62 Autoantikörper-positiven Kindern mit frühkindlicher Inselautoimmunität (Autoreaktivität gegen Inselzellen wurde vor dem 4. Lebensjahr entwickelt; medianes Alter beim erstmaligen Auftreten von Autoimmunität: 1,9 Jahre), sowie von 80 Autoantikörper-positiven Kindern mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität (Autoreaktivität gegen Inselzellen wurde mit 4 Jahren oder später entwickelt; medianes Alter beim erstmaligen Auftreten von Autoimmunität: 8,0 Jahre) aus der BABYDIAB Studie wurden auf Autoantikörper gegen Insulin (IAA), GAD 65 (GADA), IA-2 (IA-2A) und ZnT8 (ZnT8A) untersucht und hinsichtlich des Autoantikörper-Status, der Autoantikörper-Titer, der Autoantikörper-Epitop-Spezifität, der Autoantikörper-Affinität sowie hinsichtlich des Auftretens von T1DM-relevanten Genotypen charakterisiert. Alle Charakteristika wurden in univariaten Analysen zwischen den beiden Gruppen verglichen, um typische Immunisierungsmuster herauszufinden. Anschließend wurde untersucht, ob zwischen den beiden Gruppen ein Unterschied bezüglich der Progressionsrate zu multiplen AAK sowie zum T1DM besteht.

Folgende Befunde konnten erhoben werden:

1) Zum Zeitpunkt der Serokonversion (= erstmaliges Auftreten von Insel-AAk) wies die Mehrheit der Kinder beider Gruppen nur einen Autoantikörper auf. Dennoch hatten bereits zu diesem Zeitpunkt Kinder mit frühkindlicher Inselautoimmunität signifikant häufiger multiple Autoantikörper entwickelt als Personen bei denen Insel-AAk erst mit 4 Jahren oder später auftraten (27 Kinder (43,5%) vs. 17 Kinder (21,2%); ( $p=0,004$ )).

Bei beiden Gruppen waren IAA und GADA in der ersten Autoantikörper-positiven Probe die am häufigsten vorkommenden Autoantikörper. IAA hatte vor allem bei Kindern, bei denen Autoreaktivität gegen Inselzellen vor dem 4. Lebensjahr auftrat, die höchste Prävalenz und kam signifikant häufiger vor als bei Kindern mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität ( $p<0,0001$ ). Innerhalb der älteren Gruppe war die Immunantwort am häufigsten gegen GAD gerichtet, gefolgt von AAK gegen Insulin. Autoantikörper gegen IA2 und ZnT8 kamen in beiden Gruppen seltener vor, und wurden fast ausschließlich bei Personen mit multiplen Autoantikörpern beobachtet.

Hohe Autoantikörper-Titer fanden sich vor allem für IAA innerhalb der jüngeren Gruppe. IAA-Titer waren signifikant höher als bei Kindern der älteren Gruppe (Median der Titer: 9,4 U vs. 4,3 U;  $p=0,02$ ).

Signifikante Unterschiede zwischen den zwei Gruppen gab es bezüglich der IAA-Affinität. Hoch affine IAA kamen signifikant häufiger bei Kindern mit frühkindlicher Inselautoimmunität vor (85% vs. 25%,  $p<0,0001$ ).

Initiale Epitope, die beim erstmaligen Auftreten von GAD-Autoantikörpern erkannt wurden, waren in beiden Gruppen vor allem GAD-MID und GAD-COOH. Reaktivität gegen GAD-NH<sub>2</sub> wurde dagegen in beiden Gruppen seltener gefunden. Die häufigsten GAD-Epitop-Verteilungsmuster beider Gruppen waren: Reaktivität gegen *GAD-MID und GAD-COOH* sowie restringierte *GAD-MID*-Reaktivität. Ein selteneres Muster war restringierte GAD-NH<sub>2</sub>-Reaktivität. Dieses Muster kam häufiger in der Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität vor (7 Kinder vs. 1 Kind;  $p=0,07$ ) und war ausschließlich mit singularer GADA-Positivität assoziiert ( $p=0,0005$ ). Reaktivität gegen multiple Epitope kam bei 42,9% der Kinder der jüngeren Gruppe und bei 26,7% der Personen der älteren Gruppe vor, und war in beiden Gruppen signifikant mit einem hohen GADA-Titer assoziiert.

GADA-Affinitäten unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Hoch affine GADA kamen bei beiden Gruppen sehr häufig vor (Early 90,6%, Late: 80%).

Initiale Epitope, die beim erstmaligen Auftreten von IA-2-Autoantikörpern erkannt wurden, waren in beiden Gruppen vor allem die PTP-Regionen von IA-2 und IA-2 $\beta$ . Reaktivität gegen die JM-Region von IA-2 kam dagegen seltener vor. Reaktivität gegen *IA-2-PTP* und *IA-2 $\beta$*  sowie restringierte *IA-2-PTP*-Reaktivität waren in beiden Gruppen die häufigsten IA-2-Epitop-Verteilungsmuster. Etwa 50% der Kinder beider Gruppen hatten bereits beim erstmaligen Auftreten von IA-2A Autoantikörper gegen multiple Epitope entwickelt. Wie bei den GAD-Epitopen war auch Reaktivität gegen mehrere IA-2-Epitope mit hohen IA-2A-Titern assoziiert. IA-2A-Affinitäten unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Beide Gruppen hatten meist hoch affine IA-2-Autoantikörper (Kinder mit frühkindlicher Inselautoimmunität: 74%, Kinder mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität: 83%). Zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von ZnT8A, gab es bezüglich der ZnT8-Epitope keine Unterschiede zwischen den zwei Gruppen. Autoantikörper erkannten am häufigsten beide Hauptvarianten des Moleküls (*ZnT8A-Arginin* und *ZnT8A-Tryptophan*), gefolgt von restringierter Reaktivität gegen ZnT8-Arginin. Dagegen kam restringierte Reaktivität gegen ZnT8-Tryptophan seltener vor.

2) Im Verlauf von ein bis zwei Jahren nach Serokonversion (=erstmaliges Auftreten von Insel-AAk) zeigten Kinder, die Insel-AAk bereits vor dem 4. Lebensjahr entwickelten, viel häufiger eine Progression der Autoimmunität als Kinder, bei denen erst mit 4 Jahren oder später Autoreaktivität gegen Inselzellen auftrat. Letztere zeigten kaum Veränderungen ihrer Inselautoimmunität in dem kurzen Verlauf.

Bei 58,9% der Kinder mit frühkindlicher Inselautoreaktivität gab es eine Ausweitung der Immunantwort auf weitere Zielantigene. Dies konnte mit nur 16% signifikant seltener bei Kindern der Gruppe mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität beobachtet werden ( $p < 0,0001$ ). In der Follow-up-Probe hatten bereits 41 Kinder (73,2%) der jüngeren Gruppe multiple Autoantikörper. In der älteren Gruppe gab es im Verlauf zur zweiten Probe dagegen nur 22 Kinder (29,3%) mit multiplen Antikörpern ( $p < 0,0001$ ). Die Prävalenzen der IAA und GADA veränderten sich kaum. Daher blieben sie in beiden Gruppen die häufigsten AAK.

Dagegen erhöhte sich vor allem innerhalb der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität die Anzahl von Kindern mit IA-2A und ZnT8A signifikant von der ersten zur zweiten Probe, so dass diese beiden Autoantikörper hier signifikant häufiger gefunden werden konnten als bei Kindern der älteren Gruppe (IA-2A: 48,2% vs. 13,3%; ZnT8A: 55,4% vs. 25,3%;  $p=0,0003$  für beide AAK).

IAA- und GADA-Titer erhöhten sich im Verlauf signifikant bei Kindern mit frühkindlicher Inselautoimmunität. Innerhalb der älteren Gruppe gab es keine signifikanten Titer-Veränderungen, so dass Kinder der jüngeren Gruppe in der Follow-up-Probe signifikant höhere IAA- (Median der Titer: 13,1 U vs. 3,4 U;  $p=0,0002$ ) und GADA-Titer (Median der Titer: 80 U vs. 26,2 U;  $p=0,009$ ) aufwiesen als Personen der älteren Gruppe.

Hoch affine IAA kamen auch in der Follow-up-Probe bei Kindern mit frühkindlicher Inselautoimmunität signifikant häufiger vor als bei Kindern mit prä-/pubertärer Inselautoreaktivität (83% vs. 13%;  $p = 0,0009$ ).

Ein bis zwei Jahre nach dem erstmaligen Auftreten von GADA konnte bei etwa 40% der Kinder der jüngeren Gruppe intramolekulares Spreading auf weitere GAD-Epitope, vor allem auf GAD-COOH beobachtet werden. In der älteren Gruppe dagegen nur bei 20%. Obwohl Ak gegen GAD-COOH nun signifikant häufiger bei Kindern mit frühkindlicher Inselautoimmunität gefunden werden konnten (67,6% vs. 35,6%;  $p=0,007$ ), blieben GAD-MID und GAD-COOH dominante Epitope beider Gruppen. Kinder der jüngeren Gruppe wiesen in der Follow-up-Probe mit etwa 65% signifikant häufiger Reaktivität gegen multiple GAD-Epitope (vor allem gegen *GAD-MID und GAD-COOH* und gegen *alle drei Epitope*) auf als Kinder mit prä-/pubertärer Inselautoreaktivität (etwa 36%;  $p=0,01$ ). Wie bereits in der ersten Serumprobe, war Reaktivität gegen mehrere GAD-Epitope auch in der Follow-up-Probe in beiden Gruppen signifikant mit einem höheren GADA-Titer assoziiert. Restringierte Reaktivität gegen GAD-NH<sub>2</sub> blieb in beiden Gruppen konstant und war weiterhin mit singulärer GADA-Positivität assoziiert. GADA-Affinitäten änderten sich im Verlauf in beiden Gruppen kaum.

Intramolekulares Spreading auf weitere IA-2-Epitope trat im Verlauf bei etwa 58% der Kinder der jüngeren Gruppe sowie bei etwa 46% der Personen der älteren Gruppe auf. Somit wiesen nun die Kinder beider Gruppen am häufigsten Reaktivität gegen multiple IA-2-Epitope (vor allem gegen *IA-2-PTP und IA-2 $\beta$*  und gegen *alle drei Epitope*) auf. Reaktivität gegen mehrere IA-2-Epitope war in der Follow-up-Probe in beiden Gruppen signifikant mit einem hohen IA-2A-Titer assoziiert. Die Mehrheit der Kinder beider Gruppen wies weiterhin hoch affine IA-2A auf.

Bezüglich der ZnT8-Epitope gab es im Verlauf keine Veränderungen.

3) In beiden Gruppen konnte eine Assoziation zwischen dem Auftreten von multiplen Autoantikörpern und dem Vorhandensein eines Hochrisiko-HLA-Klasse-II-Genotyps bzw. zwischen persistierender singulärer Autoantikörper-Positivität und dem Vorhandensein eines protektiven HLA-Klasse-II-Genotyps beobachtet werden ( $p < 0,0001$ ). Dennoch wiesen Kinder der Gruppe mit frühkindlicher Inselautoimmunität, die im Gesamtverlauf in der Mehrheit der Fälle eine Progression zu multiplen Autoantikörpern durchmachten, signifikant häufiger einen Hochrisiko-Genotyp auf als Kinder der älteren Gruppe (42,6% vs. 23,7%;  $p = 0,02$ ). Protektive HLA-Klasse-II Allele kamen dagegen häufiger in der älteren Gruppe vor, jedoch nicht signifikant häufiger als bei Kindern mit frühkindlicher Inselautoimmunität (9,9% vs. 22,5%;  $p = 0,07$ ).

4) Kinder mit frühkindlicher Inselautoimmunität entwickelten im gesamten Nachverfolgungszeitraum signifikant häufiger multiple AAK als Kinder mit prä-/pubertärer Inselautoreaktivität (80,6% vs. 39%). Ebenso trat ein T1DM in der jüngeren Gruppe signifikant häufiger auf als in der älteren Gruppe (58,1% vs. 10%). Betrachtete man jedoch nur diejenigen Kinder beider Gruppen, die eine Progression zu multiplen Autoantikörpern oder zum T1DM aufwiesen, zeigten sich *keine* Unterschiede bezüglich der Schnelligkeit der Progression.

### Fazit

Die ermittelten Daten zeigen, dass bei Kindern, die Inselautoimmunität bereits vor dem 4. Lebensjahr entwickeln, am häufigsten *Immunisierungsmuster* auftreten, die mit einer *Progression* zum T1DM, also mit einem Fortschreiten des Inselautoimmunitätsprozesses, assoziiert sind. Außerdem weisen sie meist sehr *dynamische* Verläufe auf, was sich darin äußert, dass oftmals viele Veränderungen im Autoimmunitäts-Profil innerhalb eines kurzen Zeitraumes auftreten. Im Folgenden wird erläutert welche Progressionsmuster in der vorliegenden Arbeit häufig beobachtet wurden: Wir konnten zeigen, dass die initiale Immunantwort bei Kleinkindern sehr häufig gegen Insulin gerichtet ist, dass die Immunantwort meist hoch affin und hoch-titrig ist, sich schnell auf weitere Inselantigene (vor allem IA-2 und ZnT8) ausdehnt und dass viele dieser Kinder frühzeitig multiple Autoantikörper entwickeln.

Weiterhin unterstreichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass das frühkindliche Auftreten von Inselautoimmunität sehr häufig mit einer breiten AAK-Antwort assoziiert ist, welche an der Anzahl der erkannten Epitope gemessen werden kann.

Unsere Daten zeigen, dass Kinder mit frühkindlicher Inselautoreaktivität häufig intramolekulares Spreading aufweisen und am häufigsten die GAD-Epitope- GAD-MID und GAD-COOH und die IA-2-Epitope- IA-2-PTP und IA-2 $\beta$  erkennen. Im Gegensatz zu einer vorhergehenden Studie konnten wir nicht bestätigen, dass die juxtamembranäre Region von IA-2 als frühes Ziel der Immunreaktion gegen IA-2 fungiert, von dem ein Spreading auf die PTP-Region von IA-2 und IA-2 $\beta$  ausgeht. In unseren Beobachtungen war Reaktivität gegen IA-2-JM sowohl bei Kindern mit frühkindlicher als auch bei Kindern mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität seltener als gegen IA-2-PTP und IA-2 $\beta$ . Bezüglich der ZnT8-Epitope konnten unsere Daten bestätigen, dass Autoantikörper am häufigsten beide Hauptvarianten des Moleküls (*ZnT8A-Arginin* und *ZnT8A-Tryptophan*) erkennen, gefolgt von restringierter Reaktivität gegen ZnT8-Arginin.

In unseren Untersuchungen wiesen Kinder, die eine Autoreaktivität gegen Inselzellen erst mit 4 Jahren oder später entwickelten, am häufigsten *Immunisierungsmuster* auf, die nicht mit einem erhöhten T1DM Risiko assoziiert sind. Im kurzfristigen Verlauf zeigten sich bei einer Großzahl dieser Kinder keine Veränderungen der Autoantikörperprofile, als Zeichen eines eher *chronischen Verlaufs, ohne Progression*. Diese Immunisierungsmuster waren vor allem: singuläre GADA-Reaktivität mit niedrigen Ak-Titern und AAK gegen nur ein GAD-Epitop (vor allem GAD-NH<sub>2</sub> oder GAD-MID) und häufig auch singuläre, niedrig affine IAA-Reaktivität mit niedrigen Titern. Singuläre GADA-Reaktivität wurde bereits in früheren Arbeiten als häufiges Muster bei älteren Verwandten von Typ 1 Diabetikern beschrieben. Auch in der vorliegenden Studie wurde dieses Muster sehr häufig beobachtet. Wir konnten jedoch auch zeigen, dass singuläre, niedrig affine IAA mit niedrigen Titern ebenfalls ein sehr häufiges Immunprofil bei den älteren Kindern darstellt, welches nicht mit Progression verbunden ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Immunisierungsprofile für Kinder mit frühkindlicher und Kinder mit prä-/pubertärer Inselautoimmunität beschrieben und miteinander verglichen. Unsere Daten zeigen, dass die unterschiedlichen Immunisierungsmuster zwar in beiden Gruppen vorkommen können, sich jedoch stark in der Frequenz ihres Auftretens unterscheiden. Die ermittelten Daten machen deutlich, dass Kinder, die eine Progression des Autoimmunprozesses durchmachen und schließlich einen T1DM entwickeln, ähnliche Autoantikörper-Charakteristika aufweisen, ungeachtet des Alters beim erstmaligen Auftreten von Inselautoimmunität.

Die Aussage, dass Kinder mit fortschreitender Inselautoimmunität sich in ihrem Immunisierungsprofil ähneln wird auch durch unsere Beobachtungen unterstrichen, die zeigen, dass die Progression in beiden Altersgruppen gleich schnell verläuft. Gleichmaßen finden sich in beiden Gruppen andere Merkmale, die mit einem chronischen, nicht progressiven Verlauf assoziiert sind. Diese Unterschiede der Häufigkeiten lassen sich wiederum durch das Vorkommen prädisponierender bzw. protektiver Genotypen sowie exogener Faktoren erklären.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des T1DM bei und weisen auf neue Immunprofile hin, die zu einer besseren Diskriminierung des T1DM-Risikos Autoantikörper-positiver Kinder Bedeutung erlangen könnten, um geeignete Teilnehmer für Immuninterventionsstudien auszuwählen.

## 8. Literaturverzeichnis

- EURODIAB ACE Study Group. (2000). "Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe." Lancet **355**(9207): 873-6.
- Achenbach P., Barker J., Bonifacio E., Pre-Point Study group. (2008 a). "Modulating the natural history of type 1 diabetes in children at high genetic risk by mucosal insulin immunization." Curr Diab Rep **8**(2):87-93.
- Achenbach P., Bonifacio E., Koczwara K., Ziegler A. G. (2005). "Natural history of type 1 diabetes." Diabetes **54 Suppl 2**: S25-31.
- Achenbach P., Bonifacio E., Williams A. J., Ziegler A. G., Gale E. A., Bingley P. J.; ENDIT Group. (2008). "Autoantibodies to IA-2beta improve diabetes risk assessment in high-risk relatives." Diabetologia **51**(3): 488-92.
- Achenbach P., Koczwara K., Knopff A., Naserke H., Ziegler A. G., Bonifacio E. (2004). "Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes." J Clin Invest **114**(4): 589-97.
- Achenbach P., Lampasona V., Landherr U., Koczwara K., Krause S., Grallert H., Winkler C., Pflüger M., Illig T., Bonifacio E., Ziegler A. G. (2009). "Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk." Diabetologia **52**(9): 1881-8.
- Achenbach P., Warncke K., Reiter J., Naserke H. E., Williams A. J., Bingley P. J., Bonifacio E., Ziegler A. G. (2004). "Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics." Diabetes **53**(2): 384-92.
- Adeghate E., Schattner P., Dunn E. (2006). "An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus." Ann N Y Acad Sci **1084**: 1-29.
- Akerblom H. K., Vaarala O., Hyöty H., Ilonen J., Knip M. (2002). "Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes." Am J Med Genet **115**(1): 18-29.
- Atkinson M., Honeyman M., Peakman M., Roep B. (2000). "T-cell markers in type I diabetes: progress, prospects and realistic expectations." Diabetologia **43**(6): 819-20.
- Atkinson M. A. and Eisenbarth G.S. (2001). "Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment." Lancet **358**(9277): 221-9.
- Baekkeskov S., Aanstoot H. J., Christgau S., Reetz A., Solimena M., Cascalho M., Folli F., Richter-Olesen H., De Camilli P. (1990). "Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase." Nature **347**(6289): 151-6.
- Barrett J. C., Clayton D. G., Concannon P., Akolkar B., Cooper J. D., Erlich H. A., Julier C., Morahan G., Nerup J., Nierras C., Plagnol V., Pociot F., Schuilenburg H., Smyth D. J., Stevens H., Todd J. A., Walker N. M., Rich S. S.; Type 1 Diabetes Genetics Consortium. (2009). "Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes." Nat Genet **41**(6): 703-7.
- Bennett S. T., Lucassen A. M., Gough S. C., Powell E. E., Undlien D. E., Pritchard L. E., Merriman M. E., Kawaguchi Y., Dronsfield M. J., Pociot F. (1995). "Susceptibility to

- human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus." Nat Genet **9**(3): 284-92.
- Bingley P. J. (2010). "Clinical applications of diabetes antibody testing." J Clin Endocrinol Metab **95**(1): 25-33.
- Bingley P. J., Bonifacio E., Williams A. J., Genovese S., Bottazzo G. F., Gale E. A. (1997). "Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers." Diabetes **46**(11): 1701-10.
- Bingley P. J., Bonifacio E., Ziegler A. G., Schatz D. A., Atkinson M. A., Eisenbarth G. S.; Immunology of Diabetes Society. (2001). "Proposed guidelines on screening for risk of type 1 diabetes." Diabetes Care **24**(2): 398.
- Bingley P. J., Christie M. R., Bonifacio E., Bonfanti R., Shattock M., Fonte M. T., Bottazzo G. F., Gale E.A. (1994). "Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives." Diabetes **43**(11): 1304-10.
- Bonifacio E., Bingley P. J., Shattock M., Dean B. M., Dunger D., Gale E. A., Bottazzo G. F. (1990). "Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes." Lancet **335**(8682): 147-9.
- Bonifacio E., Genovese S., Braghi S., Bazzigaluppi E., Lampasona V., Bingley P. J., Rogge L., Pastore M. R., Boggetti E., Bottazzo G. F. (1995). "Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity." Diabetologia **38**(7): 816-22.
- Bonifacio E., Hummel M., Walter M., Schmid S., Ziegler A. G. (2004). "IDDM1 and multiple family history of type 1 diabetes combine to identify neonates at high risk for type 1 diabetes." Diabetes Care **27**(11): 2695-700.
- Bonifacio E., Lampasona V., Bernasconi L., Ziegler A. G. (2000). "Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes." Diabetes **49**(2): 202-8.
- Bonifacio E., Lampasona V., Bingley P. J. (1998). "IA-2 (islet cell antigen 512) is the primary target of humoral autoimmunity against type 1 diabetes-associated tyrosine phosphatase autoantigens." J Immunol **161**(5): 2648-54.
- Bosi E., Braghi S., Maffi P., Scirpoli M., Bertuzzi F., Pozza G., Secchi A., Bonifacio E. (2001). "Autoantibody response to islet transplantation in type 1 diabetes." Diabetes **50**(11): 2464-71.
- Bottini N., Musumeci L., Alonso A., Rahmouni S., Nika K., Rostamkhani M., MacMurray J., Meloni G. F., Lucarelli P., Pellicchia M., Eisenbarth G. S., Comings D., Mustelin T. (2004). "A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes." Nat Genet **36**(4): 337-8.
- Butler M. H., Solimena M., Dirks R. Jr., Hayday A., De Camilli P. (1993). "Identification of a dominant epitope of glutamic acid decarboxylase (GAD-65) recognized by autoantibodies in stiff-man syndrome." J Exp Med **178**(6): 2097-106.
- Buzzetti R., Quattrocchi C. C., Nisticò L. (1998). "Dissecting the genetics of type 1 diabetes: relevance for familial clustering and differences in incidence." Diabetes Metab Rev **14**(2): 111-28.
-

- Castano L., Ziegler A. G., **Ziegler R.**, Shoelson S., Eisenbarth G. S. (1993). "Characterization of insulin autoantibodies in relatives of patients with type I diabetes." Diabetes **42**(8): 1202-9.
- Christie M. R., Genovese S, Cassidy D., Bosi E., Brown T. J., Lai M., Bonifacio E., Bottazzo G. F. (1994). "Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity." Diabetes **43**(10): 1254-9.
- Colman P. G., Steele C., Couper J. J., Beresford S. J., Powell T., Kewming K., Pollard A., Gellert S., Tait B., Honeyman M., Harrison L.C. (2000). "Islet autoimmunity in infants with a Type I diabetic relative is common but is frequently restricted to one autoantibody." Diabetologia **43**(2): 203-9.
- Dahlquist G., Blom L., Holmgren G., Hägglöf B., Larsson Y., Sterky G., Wall S. (1985). "The epidemiology of diabetes in Swedish children 0-14 years--a six-year prospective study." Diabetologia **28**(11): 802-8.
- Danne T. (2010). Diabetes bei Kindern und Jugendlichen. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes. Deutscher Gesundheitsbericht 2010, 100-109
- De Grijse J., Asanghanwa M., Nouthe B., Albrecher N., Goubert P., Vermeulen I., Van Der Meeren S., Decochez K., Weets I., Keymeulen B., Lampasona V., Wenzlau J., Hutton J. C., Pipeleers D., Gorus F. K.; Belgian Diabetes Registry. (2010). "Predictive power of screening for antibodies against insulinoma-associated protein 2 beta (IA-2beta) and zinc transporter-8 to select first-degree relatives of type 1 diabetic patients with risk of rapid progression to clinical onset of the disease: implications for prevention trials." Diabetologia **53**(3): 517-24.
- Decochez K., De Leeuw I. H., Keymeulen B., Mathieu C., Rottiers R., Weets I., Vandemeulebroucke E., Truyen I., Kaufman L., Schuit F. C., Pipeleers D. G., Gorus F. K.; Belgian Diabetes Registry. (2002). "IA-2 autoantibodies predict impending type I diabetes in siblings of patients." Diabetologia **45**(12): 1658-66.
- Eehalt S., Blumenstock G., Willasch A. M., Hub R., Ranke M. B., Neu A.; DIARY-study Group Baden-Württemberg. (2008). "Continuous rise in incidence of childhood Type 1 diabetes in Germany." Diabet Med **25**(6): 755-7.
- Eisenbarth G. S. (2007). "Update in type 1 diabetes." J Clin Endocrinol Metab **92**(7): 2403-7.
- Foulis A. K., Liddle C. N., Farguharson M. A., Richmond J. A., Weir R. S. (1986). "The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom." Diabetologia **29**(5): 267-74.
- Fuchtenbusch M., Ziegler A. G., Hummel M. (2004). "Elimination of dietary gluten and development of type 1 diabetes in high risk subjects." Rev Diabet Stud **1**(1): 39-41.
- Gardner S. G., Gale E. A., Williams A. J., Gillespie K. M., Lawrence K. E., Bottazzo G. F., Bingley P. J. (1999). "Progression to diabetes in relatives with islet autoantibodies. Is it inevitable?" Diabetes Care **22**(12): 2049-54.
- Gianani R. and Eisenbarth G. S. (2005). "The stages of type 1A diabetes: 2005." Immunol Rev **204**: 232-49.
-

- Gillespie K. M. (2006). "Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention." Cmaj **175**(2): 165-70.
- Gillespie K. M., Gale E. A., Bingley P. J. (2002). "High familial risk and genetic susceptibility in early onset childhood diabetes." Diabetes **51**(1): 210-4.
- Gohlke H., Ferrari U., Koczwara K., Bonifacio E., Illig T., Ziegler A. G. (2008). "SLC30A8 (ZnT8) Polymorphism is Associated with Young Age at Type 1 Diabetes Onset." Rev Diabet Stud **5**(1): 25-7.
- Graham J., Hagopian W. A., Kockum I., Li L. S., Sanjeevi C. B., Lowe R. M., Schaefer J. B., Zarghami M., Day H. L., Landin-Olsson M., Palmer J. P., Janer-Villanueva M., Hood L., Sundkvist G., Lernmark A., Breslow N., Dahlquist G., Blohmé G.; Diabetes Incidence in Sweden Study Group; Swedish Childhood Diabetes Study Group. (2002). "Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes." Diabetes **51**(5): 1346-55.
- Group T. S. (2008). "The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study." Ann N Y Acad Sci **1150**: 1-13.
- Hagopian W. A., Michelsen B., Karlsen A. E., Larsen F., Moody A., Grubin C. E., Rowe R., Petersen J., McEvoy R., Lernmark A. (1993). "Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M(r) rather than the 67,000-M(r) isoform of glutamic acid decarboxylase." Diabetes **42**(4): 631-6.
- Hagopian W. A., Sanjeevi C. B., Kockum I., Landin-Olsson M., Karlsen A. E., Sundkvist G., Dahlquist G., Palmer J., Lernmark A. (1995). "Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children." J Clin Invest **95**(4): 1505-11.
- Hampe C. S., Hammerle L. P., Bekris L., Ortqvist E., Kockum I., Rolandsson O., Landin-Olsson M., Törn C., Persson B., Lernmark A. (2000). "Recognition of glutamic acid decarboxylase (GAD) by autoantibodies from different GAD antibody-positive phenotypes." J Clin Endocrinol Metab **85**(12): 4671-9.
- Hanninen A., Jalkanen S., Salmi M., Toikkanen S., Nikolakaros G., Simell O. (1992). "Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus." J Clin Invest **90**(5): 1901-10.
- Harjutsalo V., Sjöberg L., Tuomilehto J. (2008). "Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study." Lancet **371**(9626): 1777-82.
- Hawa M., Rowe R., Lan M. S., Notkins A. L., Pozzilli P., Christie M. R., Leslie R. D. (1997). "Value of antibodies to islet protein tyrosine phosphatase-like molecule in predicting type 1 diabetes." Diabetes **46**(8): 1270-5.
- Honeyman M. C., Coulson B. S., Stone N. L., Gellert S. A., Goldwater P. N., Steele C. E., Couper J. J., Tait B. D., Colman P. G., Harrison L. C. (2000). "Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes." Diabetes **49**(8): 1319-24.
- Hoppu S., Ronkainen M. S., Kulmala P., Akerblom H. K., Knip M.; Childhood Diabetes in Finland Study Group. (2004). "GAD65 antibody isotypes and epitope recognition during the prediabetic process in siblings of children with type 1 diabetes." Clin Exp Immunol **136**(1): 120-8.
-

- Hummel M., Bonifacio E., Schmid S., Walter M., Knopff A., Ziegler A. G. (2004). "Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents." Ann Intern Med **140**(11): 882-6.
- Hypponen E., Laara E., Reunanen A., Järvelin M. R., Virtanen S. M. (2001). "Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study." Lancet **358**(9292): 1500-3.
- Hyttinen V., Kaprio J., Kinnunen L., Koskenvuo M., Tuomilehto J. (2003). "Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study." Diabetes **52**(4): 1052-5.
- Itoh N., Hanafusa T., Miyazaki A., Miyagawa J., Yamagata K., Yamamoto K., Waguri M., Imagawa A., Tamura S., Inada M. (1993). "Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients." J Clin Invest **92**(5): 2313-22.
- Karjalainen J., Salmela P., Ilonen J., Surcel H. M., Knip M. (1989). "A comparison of childhood and adult type I diabetes mellitus." N Engl J Med **320**(14): 881-6.
- Karvonen M., Viik-Kajander M., Moltchanova E., Libman I., LaPorte R., Tuomilehto J. (2000). "Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group." Diabetes Care **23**(10): 1516-26.
- Kaufman D. L., Erlander M. G., Clare-Salzler M., Atkinson M. A., Maclaren N. K., Tobin A. J. (1992). "Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus." J Clin Invest **89**(1): 283-92.
- Kimpimäki T., Kulmala P., Savola K., Kupila A., Korhonen S., Simell T., Ilonen J., Simell O., Knip M. (2002). "Natural history of beta-cell autoimmunity in young children with increased genetic susceptibility to type 1 diabetes recruited from the general population." J Clin Endocrinol Metab **87**(10): 4572-9.
- Kimpimäki T., Kupila A., Hamalainen A. M., Kukko M., Kulmala P., Savola K., Simell T., Keskinen P., Ilonen J., Simell O., Knip M. (2001). "The first signs of beta-cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: the Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study." J Clin Endocrinol Metab **86**(10): 4782-8.
- Krischer J. P., Cuthbertson D. D., Yu L., Orban T., Maclaren N., Jackson R., Winter W. E., Schatz D. A., Palmer J. P., Eisenbarth G. S. (2003). "Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes." J Clin Endocrinol Metab **88**(1): 103-8.
- Krolewski A. S., Warram J. H., Rand LI, Kahn C. R. (1987). "Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications." N Engl J Med **317**(22): 1390-8.
- Kukko M., Virtanen S. M., Toivonen A., Simell S., Korhonen S., Ilonen J., Simel O., Knip M. (2004). "Geographical variation in risk HLA-DQB1 genotypes for type 1 diabetes and signs of beta-cell autoimmunity in a high-incidence country." Diabetes Care **27**(3): 676-81.
- Kulmala P., Savola K., Petersen J. S., Vahasalo P., Karjalainen J., Lopponen T., Dyrberg T., Akerblom H. K., Knip M. (1998). "Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in

- siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group." J Clin Invest **101**(2): 327-36.
- Kulmala P., Savola K., Reijonen H., Veijola R., Vahasalo P., Karjalainen J., Tuomilehto-Wolf E., Ilonen J., Tuomilehto J., Akerblom H. K., Knip M. (2000). "Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group." Diabetes **49**(1): 48-58.
- Kyvik K. O., Green A., Beck-Nielsen H. (1995). "Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins." Bmj **311**(7010): 913-7.
- LaGasse J. M., Brantley M. S., Leech N.J., Rowe R. E., Monks S., Palmer J. P., Nepom G. T., McCulloch D. K., Hagopian W. A.; Washington State Diabetes Prediction Study. (2002). "Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of the Washington State Diabetes Prediction Study." Diabetes Care **25**(3): 505-11.
- Lampasona V., Bearzatto M., Genovese S., Bosi E., Ferrari M., Bonifacio E. (1996). "Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen." J Immunol **157**(6): 2707-11.
- Lampasona V., Schlosser M., Mueller P. W., Williams A. J., Wenzlau J. M., Hutton J. C., Achenbach P. (2011). "Diabetes antibody standardization program: first proficiency evaluation of assays for autoantibodies to zinc transporter 8." Clin Chem **57**(12): 1693-702.
- Lan M. S., Lu J., Goto Y., Notkins A. L. (1994). "Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma." DNA Cell Biol **13**(5): 505-14.
- Lan M. S., Wasserfall C., Maclaren N. K., Notkins A. L. (1996). "IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6367-70.
- Leslie R. D., Atkinson M. A., Notkins A. L. (1999). "Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes." Diabetologia **42**(1): 3-14.
- Lieberman S. M. and DiLorenzo T. P. (2003). "A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes." Tissue Antigens **62**(5): 359-77.
- Lohmann T., Kellner K., Verlohren H. J., Krug J., Steindorf J., Scherbaum W. A., Seissler J. (2001). "Titre and combination of ICA and autoantibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate two clinically distinct types of latent autoimmune diabetes in adults (LADA)." Diabetologia **44**(8): 1005-10.
- Lonnrot M., Korpela K., Knip M., Ilonen J., Simell O., Korhonen S., Savola K., Muona P., Simell T., Koskela P., Hyoty H. (2000). "Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study." Diabetes **49**(8): 1314-8.
- Lu J., Li Q., Xie H., Chen Z. J., Borovitskaya A. E., Maclaren N. K., Notkins A. L., Lan M. S. (1996). "Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-

- 2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2307-11.
- Ludvigsson J., Faresjo M., Hjorth M., Axelsson S., Cheramy M., Pihl M., Vaarala O., Forsander G., Ivarsson S., Johansson C., Lindh A., Nilsson N. O., Aman J., Ortqvist E., Zerhouni P., Casas R. (2008). "GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes." N Engl J Med **359**(18): 1909-20.
- Mayr A., Schlosser M., Grober N., Kenk H., Ziegler A. G., Bonifacio E., Achenbach P. (2007). "GAD autoantibody affinity and epitope specificity identify distinct immunization profiles in children at risk for type 1 diabetes." Diabetes **56**(6): 1527-33.
- Menser M. A., Forrest J. M., Bransby R. D. (1978). "Rubella infection and diabetes mellitus." Lancet **1**(8055): 57-60.
- Morgenthaler N. G., Seissler J., Achenbach P., Glawe D., Payton M., Meinck H. M., Christie M. R., Scherbaum W. A. (1997). "Antibodies to the tyrosine phosphatase-like protein IA-2 are highly associated with IDDM, but not with autoimmune endocrine diseases or stiff man syndrome." Autoimmunity **25**(4): 203-11.
- Naserke H. E., Bonifacio E., Ziegler A. G. (1999). "Immunoglobulin G insulin autoantibodies in BABYDIAB offspring appear postnatally: sensitive early detection using a protein A/G-based radiobinding assay." J Clin Endocrinol Metab **84**(4): 1239-43.
- Naserke H. E., Ziegler A. G., Lampasona V., Bonifacio E. (1998). "Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes." J Immunol **161**(12): 6963-9.
- Nathan D. M., Lachin J., Cleary P., Orchard T., Brillon D. J., Backlund J. Y., O'Leary D. H., Genuth S.; Diabetes Control and Complications Trial; Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. (2003). "Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus." N Engl J Med **348**(23): 2294-303.
- Neu A., Willasch A., Eehalt S., Kehrer M., Hub R., Ranke M. B. (2001). "Diabetes incidence in children of different nationalities: an epidemiological approach to the pathogenesis of diabetes." Diabetologia **44 Suppl 3**: B21-6.
- Norris J. M., Barriga K., Klingensmith G., Hoffman M., Eisenbarth G. S., Erlich H. A., Rewers M. (2003). "Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity." Jama **290**(13): 1713-20.
- Palmer J. P., Asplin C. M., Clemons P., Lyen K., Tatpati O., Raghu P. K., Paquette T. L. (1983). "Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment." Science **222**(4630): 1337-9.
- Patterson C. C., Dahlquist G. G., Gyürüs E, Green A, Soltész G; EURODIAB Study Group. (2009). "Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study." Lancet **373**(9680): 2027-33.
- Pociot F., Akolkar B., Concannon P., Erlich H. A., Julier C., Morahan G., Nierras C. R., Todd J. A., Rich S. S., Nerup J. (2010). "Genetics of type 1 diabetes: what's next?" Diabetes **59**(7): 1561-71.
-

- Pugliese A., Gianani R., Moromisato R., Awdeh Z. L., Alper C. A., Erlich H. A., Jackson R. A., Eisenbarth G. S. (1995). "HLA-DQB1\*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM." Diabetes **44**(6): 608-13.
- Rabin D. U., Pleasic S. M., Shapiro J. A., Yoo-Warren H., Oles J., Hicks J. M., Goldstein D. E., Rae P. M. (1994). "Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases." J Immunol **152**(6): 3183-8.
- Redondo M. J. and Eisenbarth G. S. (2002). "Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders." Diabetologia **45**(5): 605-22.
- Redondo M. J., Jeffrey J., Fain P. R., Eisenbarth G. S., Orban T. (2008). "Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins." N Engl J Med **359**(26): 2849-50.
- Rewers M., Norris J. M., Eisenbarth G. S., Erlich H. A., Beaty B., Klingensmith G., Hoffman M., Yu L., Bugawan T. L., Blair A., Hamman R. F., Groshek M., McDuffie R. S. Jr. (1996). "Beta-cell autoantibodies in infants and toddlers without IDDM relatives: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY)." J Autoimmun **9**(3): 405-10.
- Ronkainen M. S., Hoppu S., Korhonen S., Simell S., Veijola R., Ilonen J., Simell O., Knip M. (2006). "Early epitope- and isotype-specific humoral immune responses to GAD65 in young children with genetic susceptibility to type 1 diabetes." Eur J Endocrinol **155**(4): 633-42.
- Sadauskaite-Kuehne V., Ludvigsson J., Padaiga Z., Jasinskiene E., Samuelsson U. (2004). "Longer breastfeeding is an independent protective factor against development of type 1 diabetes mellitus in childhood." Diabetes Metab Res Rev **20**(2): 150-7.
- Savola K, Laara E, Vahasalo P, Kulmala P, Akerblom HK, Knip M, and the Childhood Diabetes in Finland Study Group, 2001. Dynamic Pattern of Disease-associated autoantibodies in siblings of children with type 1 diabetes. Diabetes 50:2625-32.
- Schlosser M., Koczwara K., Kenk H., Strebelow M., Rjasanowski I., Wassmuth R., Achenbach P., Ziegler A. G., Bonifacio E. (2005). "In insulin-autoantibody-positive children from the general population, antibody affinity identifies those at high and low risk." Diabetologia **48**(9): 1830-2.
- Schlosser M., Mueller P. W., Törn C., Bonifacio E., Bingley P. J.; Participating Laboratories. (2010). "Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for insulin autoantibodies." Diabetologia **53**(12): 2611-20.
- Schlosser M., Strebelow M., Wassmuth R., Arnold M. L., Breunig I., Rjasanowski I., Ziegler B., Ziegler M. (2002). "The Karlsburg type 1 diabetes risk study of a normal schoolchild population: association of beta-cell autoantibodies and human leukocyte antigen-DQB1 alleles in antibody-positive individuals." J Clin Endocrinol Metab **87**(5): 2254-61.
- Seissler J., Amann J., Mauch L., Haubruck H., Wolfahrt S., Bieg S., Richter W., Holl R., Heinze E., Northemann W. (1993). "Prevalence of autoantibodies to the 65- and 67-kD isoforms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus." J Clin Invest **92**(3): 1394-9.
- Seissler J., Bieg S., Yassin N., Mauch L., Northemann W., Boehm B. O., Scherbaum W. A. (1994). "Association between antibodies to the MR 67,000 isoform of glutamate

- decarboxylase (GAD) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus with coexisting autoimmune polyendocrine syndrome type II." Autoimmunity **19**(4): 231-8.
- Seissler J., Morgenthaler N. G., Achenbach P., Lampeter E. F., Glawe D., Payton M., Christie M., Scherbaum W. A. (1996). "Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. The DENIS Study Group. Deutsche Nikotinamid Interventions-Studie." Diabetologia **39**(11): 1351-6.
- Simell O., Winter W. E., Schatz D. (2010). "Enhancing the understanding of pre-type 1 diabetes in the general population." Diabetes Care **33**(6): 1403-5.
- Soderbergh A., Myhre A. G., Ekwall O., Gebre-Medhin G., Hedstrand H., Landgren E., Miettinen A., Eskelin P., Halonen M., Tuomi T., Gustafsson J., Husebye E. S., Perheentupa J., Gylling M., Manns M. P., Rorsman F., Kämpe O., Nilsson T. (2004). "Prevalence and clinical associations of 10 defined autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type I." J Clin Endocrinol Metab **89**(2): 557-62.
- Solimena M., Folli F., Aparisi R., Pozza G., De Camilli P. (1990). "Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome." N Engl J Med **322**(22): 1555-60.
- Soltesz G., Patterson C. C., Dahlquist G.; EURODIAB Study Group. (2007). "Worldwide childhood type 1 diabetes incidence--what can we learn from epidemiology?" Pediatr Diabetes **8 Suppl 6**: 6-14.
- Strebelow M., Schlosser M., Ziegler B., Rjasanowski I., Ziegler M. (1999). "Karlsburg Type I diabetes risk study of a general population: frequencies and interactions of the four major Type I diabetes-associated autoantibodies studied in 9419 schoolchildren." Diabetologia **42**(6): 661-70.
- Todd J. A. (2010). "Etiology of type 1 diabetes." Immunity **32**(4): 457-67.
- Todd J. A., Walker N. M., Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszko JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG. (2007). "Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes." Nat Genet **39**(7): 857-64.
- Torn C., Mueller P. W., Schlosser M., Bonifacio E., Bingley P. J.; Participating Laboratories. (2008). "Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2." Diabetologia **51**(5): 846-52.
- Torres M. and Casadevall A. (2008). "The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity." Trends Immunol **29**(2): 91-7.
- Vaarala O., Knip M., Paronen J., Hamalainen A. M., Muona P., Vaatainen M., Ilonen J., Simell O., Akerblom H. K. (1999). "Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes." Diabetes **48**(7): 1389-94.
-

- Vafiadis P., Bennett S. T., Todd J. A., Nadeau J., Grabs R., Goodyer C. G., Wickramasinghe S., Colle E., Polychronakos C. (1997). "Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus." Nat Genet **15**(3): 289-92.
- Vahasalo P., Knip M., Karjalainen J., Tuomilehto-Wolf E., Lounamaa R., Akerblom H. K. (1996). "Islet cell-specific autoantibodies in children with insulin-dependent diabetes mellitus and their siblings at clinical manifestation of the disease. Childhood Diabetes in Finland Study Group." Eur J Endocrinol **135**(6): 689-95.
- Vandewalle C. L., Coeckelberghs M. I., De Leeuw I. H., Du Caju M. V., Schuit F. C., Pipeleers D. G., Gorus F. K. (1997). "Epidemiology, clinical aspects, and biology of IDDM patients under age 40 years. Comparison of data from Antwerp with complete ascertainment with data from Belgium with 40% ascertainment. The Belgian Diabetes Registry." Diabetes Care **20**(10): 1556-61.
- Vandewalle C. L., Decraene T., Schuit F. C., De Leeuw I. H., Pipeleers D. G., Gorus F. K. (1993). "Insulin autoantibodies and high titre islet cell antibodies are preferentially associated with the HLA DQA1\*0301-DQB1\*0302 haplotype at clinical type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus before age 10 years, but not at onset between age 10 and 40 years. The Belgian Diabetes Registry." Diabetologia **36**(11): 1155-62.
- Vardi P., Ziegler A. G., Mathews J. H., Dib S., Keller R. J., Ricker A. T., Wolfsdorf J. I., Herskowitz R. D., Rabizadeh A., Eisenbarth G. S. (1988). "Concentration of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes. Inverse log-linear correlation with age." Diabetes Care **11**(9): 736-9.
- Vermeulen I., Weets I., Costa O., Asanghanwa M., Verhaeghen K., Decochez K., Ruige J., Casteels K., Wenzlau J., Hutton J. C., Pipeleers D. G., Gorus F. K.: Belgian Diabetes Registry. (2012). "An important minority of prediabetic first-degree relatives of type 1 diabetic patients derives from seroconversion to persistent autoantibody positivity after 10 years of age." Diabetologia **55**(2): 413-20.
- Walter M., Albert E., Conrad M., Keller E., Hummel M., Ferber K., Barratt B. J., Todd J. A., Ziegler A. G., Bonifacio E. (2003). "IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of Type 1 diabetes and associated autoimmunity." Diabetologia **46**(5): 712-20.
- Wang C., Kerckhofs K., Van de Castele M., Smolders I., Pipeleers D., Ling Z. (2006). "Glucose inhibits GABA release by pancreatic beta-cells through an increase in GABA shunt activity." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(3): E494-9.
- Wasmeier C. and Hutton J. C. (1996). "Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes." J Biol Chem **271**(30): 18161-70.
- Wenzlau J. M., Juhl K., Yu L., Moua O., Sarkar S. A., Gottlieb P., Rewers M., Eisenbarth G. S., Jensen J., Davidson H. W., Hutton J. C. (2007). "The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(43): 17040-5.
- Wenzlau J. M., Liu Y., Yu L., Moua O., Fowler K. T., Rangasamy S., Walters J., Eisenbarth G. S., Davidson H. W., Hutton J. C. (2008). "A common nonsynonymous single nucleotide polymorphism in the SLC30A8 gene determines ZnT8 autoantibody specificity in type 1 diabetes." Diabetes **57**(10): 2693-7.
-

- Williams A. J., Bingley P. J., Bonifacio E., Palmer J. P., Gale E. A. (1997). "A novel micro-assay for insulin autoantibodies." J Autoimmun **10**(5): 473-8.
- Yu J., Yu L., Bugawan T. L., Erlich H. A., Barriga K., Hoffman M., Rewers M., Eisenbarth G. S. (2000). "Transient antiislet autoantibodies: infrequent occurrence and lack of association with "genetic" risk factors." J Clin Endocrinol Metab **85**(7): 2421-8.
- Ziegler A. G., Hillebrand B., Rabl W., Mayrhofer M., Hummel M., Mollenhauer U., Vordemann J., Lenz A., Standl E. (1993). "On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth." Diabetologia **36**(5): 402-8.
- Ziegler A. G., Hummel M., Schenker M., Bonifacio E. (1999). "Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study." Diabetes **48**(3): 460-8.
- Ziegler A. G., Schmid S., Huber D., Hummel M., Bonifacio E. (2003). "Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies." Jama **290**(13): 1721-8.
- Zimmet P. Z. (1995). "The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. Genes, autoimmunity, and demography." Diabetes Care **18**(7): 1050-64.
-

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Epitop-Spezifitäten (Modifiziert nach Warncke K., 2004).....	13
Tab.1: Charakterisierung der untersuchten Kohorte.....	20
Tab.2: Prävalenzen der Autoantikörper bei Serokonversion.....	30
Abb.2: IAA- und GADA-Titer bei Serokonversion.....	31
Abb.3: Titer der drei GAD-Epitope in der jeweils ersten GADA-positiven Serumprobe.....	32
Abb.4: GAD-Epitop-Verteilungsmuster in der jeweils ersten GADA-positiven Serumprobe.....	33
Abb.5: Beziehung zwischen der GAD-Epitop Anzahl und dem GADA Titer in der jeweils ersten GADA-positiven Serumprobe.....	33
Abb.6: Titer der drei IA-2-Epitope in der jeweils ersten IA-2A-positiven Serumprobe.....	35
Abb.7: IA-2-Epitop-Verteilungsmuster in der jeweils ersten IA-2A-positiven Serumprobe.....	36
Abb.8: Beziehung zwischen der IA-2-Epitop Anzahl und dem IA-2A Titer in der jeweils ersten IA-2A-positiven Serumprobe.....	36
Abb.9: ZnT8-Epitop-Verteilungsmuster in der jeweils ersten ZnT8A- positiven Serumprobe.....	37
Abb.10: Autoantikörper-Affinitäten in der jeweils ersten Ak-positiven Serumprobe.....	39

Abb.11: Progression der Autoantikörper-Anzahl bei Early und Late beim erstmaligen Auftreten von Autoimmunität, 1-2 Jahre später und im Gesamtverlauf.....	40
Tab.3.: Prävalenzen der Autoantikörper in der Follow-up-Serumprobe.....	41
Abb.12: IAA- und GADA-Titer in der Follow-up-Serumprobe.....	42
Tab.4: Autoantikörper gegen GAD-spezifische Epitope in der Follow-up-Probe.....	44
Abb.13: Verlauf und Prävalenzen der GAD-Epitop-Verteilungsmuster von der jeweils ersten GADA-positiven Serumprobe zur Follow-up-Probe.....	45
Tab.5: Autoantikörper gegen IA-2-spezifische Epitope in der Follow-up-Probe.....	46
Abb.14: Verlauf und Prävalenzen der IA-2-Epitop-Verteilungsmuster von der jeweils ersten IA-2A-positiven Serumprobe zur Follow-up Probe.....	47
Abb.15: Verlauf und Prävalenzen der ZnT8-Epitop-Verteilungsmuster von der jeweils ersten ZnT8A-positiven Serumprobe zur Follow-up Probe.....	48
Abb.16: Vergleichende Darstellung der Autoantikörper-Affinitäten zwischen der Early und Late Gruppe in der Follow-up-Probe.....	50
Tab.6: Prävalenzen der HLA-Klasse-II-Genotypen.....	51
Abb.17: Life Table Analyse: Kumulatives Risiko für die Entwicklung multipler Autoantikörper innerhalb von 6 Jahren bei Kindern, die einen protektiven, einen neutralen, einen moderaten, oder einen hochrisiko-HLA-DR/DQ-Genotyp aufwiesen.....	52
Tab.7: Prävalenzen der INS VNTR-Genotypen.....	53
Tab.8: Prävalenzen des SLC30A8 (SNP) rs 13266634-Genotyps.....	54

Abb.18: Life Table Analyse: Kumulatives Risiko für die Entwicklung multipler Autoantikörper innerhalb von 10 Jahren bei Kindern der Early Gruppe und bei Kindern der Late Gruppe, die nur einen AAK bei Serokonversion aufwiesen.....	55
Abb.19: Life Table Analyse: Progression zu multiplen Autoantikörpern innerhalb von 6 Jahren, bei Kindern der Early Gruppe und bei Kindern der Late Gruppe, die nur einen AAK bei Serokonversion aufwiesen.....	56
Abb.20: Life Table Analyse: Kumulatives Risiko für die Entwicklung eines T1DM in einem Zeitraum von 10 Jahren nach der Entwicklung multipler AAK.....	57
Abb.21: Autoimmunitätsmuster der Early und LateGruppe im Verlauf.....	58

---

## 10. Danksagung

Mein herausragender Dank gilt Frau Prof. Dr. Anette-G. Ziegler für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, die Vergabe des interessanten Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Peter Achenbach für die exzellente Betreuung und kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Frau Stephanie Krause danke ich für die ausgezeichnete Anleitung und Unterstützung beim Erlernen der Arbeitstechniken.

Herzlichen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter des Instituts für Diabetesforschung für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern und meinen Geschwistern danken, die mir zu jeder Zeit als größte Stütze zur Seite standen.

---

**11. Vorträge, Abstract**

R. Chmiel, S. Krause, A. Knopff, C. Matzke, D. Höfelmann, J. Schenkel, A. G. Ziegler, P. Achenbach.

“Immunization profiles and progression of islet autoimmunity in children at type 1 diabetes risk”

Internationales Workshop Symposium des Deutschen Kompetenznetzes für Diabetes mellitus, September 2009 in München

R. Chmiel, S. Krause, A. Knopff, C. Matzke, D. Höfelmann, J. Schenkel, A. G. Ziegler, P. Achenbach.

“Immunization profiles and progression of islet autoimmunity in children at type 1 diabetes risk”

47. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG), Mai 2012 in Stuttgart

---



